

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES D'ORSAY
UNIVERSITÉ DE PARIS

pour obtenir
le grade de Docteur ès sciences

par

Jean-Pierre RAYNAUD

DISTRIBUTION LIAISON ET ACTION DE DÉRIVÉS DE L'OESTRADIOL

Soutenue le 9 juin 1971 devant la commission d'examen

MM. TONNELAT Président
BAULIEU }
MOREL } Examineurs

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES D'ORSAY
UNIVERSITÉ DE PARIS

pour obtenir
le grade de Docteur ès sciences

par

Jean-Pierre RAYNAUD

DISTRIBUTION LIAISON ET ACTION DE DÉRIVÉS DE L'OESTRADIOL

Soutenue le 9 juin 1971 devant la commission d'examen

MM. TONNELAT Président

BAULIEU }

MOREL }

Examineurs

Je remercie, Monsieur E.E. BAULIEU qui a dirigé ce travail et dont les conseils et les encouragements m'ont été précieux.

Messieurs J. TONNELAT et F. MOREL qui ont bien voulu juger cette thèse.

Monsieur E. SAKIZ qui m'a accordé son appui et toutes facilités pour réaliser ce travail.

Mesdames G. AZADIAN-BOULANGER, D. GALLET-BOURQUIN, T. BRECY, Messieurs D. PHILIBERT, J. SALMON, Mademoiselle J. GOVIN, Mesdames C. MERCIER-BODARD, I. JUNG, Mesdemoiselles A. ALBERGA, M.C. LEBEAU, Monsieur E. MILGROM, qui m'ont aidé au cours de ces expériences ou de la rédaction de ce texte.



TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	1
 <u>1ERE PARTIE : ANALYSE QUANTITATIVE DES INTERACTIONS</u> <u>STEROIDES-PROTEINES</u>	 5
 <u>1ER CHAPITRE : TECHNIQUES DE MESURES</u>	 6
I - TECHNIQUES NE MODIFIANT PAS L'EQUILIBRE	7
1) Dialyse à l'équilibre	7
2) Ultrafiltration	10
3) Solubilité et partage	10
4) Spectrophotométrie	11
II - TECHNIQUES MODIFIANT L'EQUILIBRE	12
1) Colonnes de Séphadex	12
2) Electrophorèse	13
3) Ultracentrifugation	13
4) Adsorbants	14
5) Précipitation	15

2EME CHAPITRE : REPRESENTATION GRAPHIQUE DE LA LIAISON ET DETERMINATION DE SES PARAMETRES	16
I - GENERALITES	17
II - SYSTEMES DE LIAISON	18
1) Cas d'une liaison spécifique "S"	18
2) Cas d'une liaison non spécifique "NS"	20
3) Cas d'une liaison spécifique en présence d'une liaison non spécifique : système S + NS	21
4) Cas de deux liaisons spécifiques en présence : système $S_I + S_{II}$	23
5) Cas de deux liaisons S_I spécifiques et d'une liaison non spécifique en présence : système $S_I + S_{II} + NS$.	24
III - ANALYSE MATHEMATIQUE ET STATISTIQUE	25
IV - DISCUSSION	26
3EME CHAPITRE : EXEMPLES D'INTERACTIONS ENTRE STEROIDES HORMONAUX ET PROTEINES	29
I - INTERACTIONS AU NIVEAU PLASMATIQUE	31
1) Système S	31
LIAISON A LA "CORTICOSTEROID BINDING GLOBULIN" (C.B.G.)	31
Généralités	31
Liaison de la corticostérone	32
Liaison du sulfate de corticostérone	34
Liaison de la progestérone	34
LIAISON A LA "SEX STEROIDS BINDING PLASMA PROTEIN" (S.B.P.)	34
Généralités	34
Liaison de la testostérone et de l'oestradiol.	36
2) Systèmes $S_I + S_{II}$	38
LIAISON A LA S.B.P. ET A LA C.B.G.	38
Liaison de la testostérone	38
3) Système S + NS	40
LIAISON A LA FRACTION IV	40
Généralités	40
Liaison de la corticostérone	40
4) Système $S_I + S_{II} + NS$	42
LIAISON AU PLASMA HUMAIN	42
Liaison de la testostérone	42

II - INTERACTIONS AU NIVEAU TISSULAIRE	46
LIAISON DE L'OESTRADIOL AUX PROTEINES CYTOSOLUBLES	46
<i>Endomètre de Truie</i>	46
<i>Utérus de Rate impubère</i>	48
<i>Endomètre de Génisse</i>	50
LIAISON DE L'OESTRADIOL A UNE PROTEINE NUCLEAIRE	52
<i>Préparation n° 1</i>	52
<i>Préparation n° 2</i>	54
<i>Préparation n° 3</i>	54
CONCLUSION	58
2EME PARTIE : <u>DISTRIBUTION ET ACTION DE DERIVES</u> <u>DE L'OESTRADIOL</u>	60
INTRODUCTION	61
1ER CHAPITRE : REPONSE BIOLOGIQUE	68
STEROIDES	70
EXPERIENCES BIOLOGIQUES	70
ACTIVITE UTEROTROPHIQUE CHEZ LA SOURIS	70
ACTIVITE UTEROTROPHIQUE CHEZ LA RATE	71
ACTIVITE UTEROTROPHIQUE "DYNAMIQUE" APRES INJECTION UNIQUE	71
RESULTATS	72
2EME CHAPITRE : CAPTATION DU STEROIDE	76
REPONSE BIOLOGIQUE ET CAPTATION	77
CAPTATION PREFERENTIELLE	80
3EME CHAPITRE : METABOLISME	85
MATERIEL ET METHODES	86
RESULTATS	86
AU NIVEAU DE L'UTERUS	86
AU NIVEAU DU PLASMA	88

4EME CHAPITRE : SITES DE FIXATION DES OESTROGENES	90
MATERIEL ET METHODES	91
PROTEINES	91
MESURE DES INTERACTIONS STEROIDES-PROTEINES	91
<i>Dialyse à l'équilibre</i>	91
<i>Ultracentrifugation</i>	92
RESULTATS	93
LIAISON SPECIFIQUE DANS L'UTERUS	93
LIAISON SPECIFIQUE DANS LE PLASMA	100
LIAISON NON SPECIFIQUE DANS L'UTERUS ET DANS LE PLASMA	105
DISCUSSION	110
CONCLUSION	113
DISTRIBUTION ET ACTION	113
PROTEINES TISSULAIRES ET ACTION	114
PROTEINES PLASMATIQUES ET DISTRIBUTION	114
BIBLIOGRAPHIE	117
APPENDICE I : TABLEAUX RECAPITULATIFS DE L'UTILISATION DES TECHNIQUES DE MESURE	135
APPENDICE II : METHODE DE REGRESSION	146
APPENDICE III : AJUSTEMENTS D'EQUATIONS NON LINEAIRES	147
APPENDICE IV PROGRAMME DE CALCUL RELATIF A L'ANALYSE DES EXPERIENCES DE LIAISON (B.E.A.)	150

INTRODUCTION

Les interactions non covalentes entre petites molécules et macromolécules font l'objet d'un intérêt croissant depuis une vingtaine d'années. En effet, leur rôle dans les mécanismes d'actions biologiques se révèle fondamental. Le développement récent de la pharmacologie moléculaire, *Belleau (1964)*, *Ariens (1966)*, *Van Rossum (1966)*, *MacKay (1966)*, *Mautner (1967)*, *Waud (1968)*, *Meyer et Guttman (1968)*, *Ehrenpreis, Fleisch et Mittag (1969)* montre combien l'analyse, à l'échelle moléculaire, des interactions entre petites molécules (hormones, médicaments) et macromolécules (protéines à l'exclusion des enzymes), offre une voie fructueuse pour la compréhension des rapports biophysicochimiques impliqués dans toute la séquence d'évènements conduisant à un effet hormonal ou thérapeutique.

Mais déjà en 1949, *Scatchard* écrit :

"Dans tous les cas de liaison d'une molécule ou d'un ion avec une protéine, il importe de répondre aux quatre questions : combien de molécules se lient ? avec quelle force, où, et pourquoi ? . La réponse aux deux premières questions et quelquefois à la troisième, peut être donnée par le physicochimiste, mais il sera souvent nécessaire de faire appel à un chimiste organicien qui, en modifiant certains groupes spécifiques, démontrera s'ils sont ou non réactifs. Quant au rôle de cette liaison, seul, un biologiste ou un biochimiste pourra le déterminer. Mais la réponse à l'ensemble des problèmes les plus compliqués dépendra de la réponse aux questions simples : combien et avec quelle force ?"

Cette approche expérimentale est encore actuelle et délimite le cadre de toute analyse des interactions petites molécules-macromolécules.

Les interactions stéroïdes-protéines, objet de la première partie de cette étude, présentent des caractéristiques particulières, déterminantes dans le choix d'une technique de mesure. En effet, les stéroïdes sont peu solubles et se lient avec une plus ou moins grande affinité à de nombreuses protéines. Ces protéines sont elles-mêmes relativement peu stables et difficiles à purifier. Aussi convient-il de choisir des techniques permettant, d'une part de différencier les diverses protéines liantes sans les dénaturer ni dissocier les complexes et, d'autre part de faire varier très largement la concentration du stéroïde.

Dans le premier chapitre de la première partie, une revue générale des techniques utilisées permet, en tenant compte de leurs avantages et inconvénients respectifs, de sélectionner la plus appropriée à un problème donné. Une méthode graphique est développée dans le second chapitre, essentiellement dans le but de permettre une meilleure visualisation et évaluation des interactions et de tous les paramètres qui en dépendent. De plus, l'analyse statistique de cette méthode est décrite. Dans un troisième chapitre, l'intérêt de l'analyse mathématique est montré et le choix de la technique de mesure justifié par des exemples d'applications où différentes préparations de protéines liantes sont analysées.

La deuxième partie est consacrée à une étude des protéines liantes dans la distribution des oestrogènes et leur action biologique. Ces interactions font partie d'une chaîne de réactions dont les différentes étapes peuvent s'insérer dans un modèle pharmacodynamique. C'est à partir de l'étude du mode d'action des oestrogènes que ce modèle est élaboré. Ce domaine de l'endocrinologie sexuelle forme un cadre privilégié pour une telle approche. En effet, depuis plusieurs années et par de nombreux auteurs, le destin des oestrogènes dans un organisme vivant est largement étudié, les interactions tant au niveau plasmatique que tissulaire sont mesurées, des récepteurs dans un des principaux organes cibles (utérus) sont mis en évidence, et la spécificité hormonale et tissulaire, la captation, le métabolisme et l'activité physiologique de l'hormone font l'objet de nombreux travaux.

Dans cette deuxième partie, l'activité biologique est mesurée par la réponse de l'utérus après une injection unique et équivalente pour tous les stéroïdes. Puis la distribution dans différents organes précède l'étude du métabolisme qui conduit à la différenciation entre composé actif et métabolite actif. Enfin, les interactions plasmatiques et tissulaires sont étudiées par les mêmes méthodes que celles décrites dans la première partie. A partir de toutes ces données, est élaboré le modèle pharmacodynamique qui fait l'objet de la discussion et permet de dégager une relation structure-activité.

Cette relation est importante à la fois pour élaborer des produits nouveaux dans la recherche pharmaceutique et pour approfondir les mécanismes d'action dans la recherche biologique. Malheureusement, le problème n'est pas toujours abordé en tenant compte de tous les paramètres déterminant l'activité rattachée à une structure chimique, limitant ainsi la portée de telles études. Ainsi pour ne donner que deux exemples, des relations sont établies en étudiant soit les propriétés physicochimiques de la molécule, soit les interactions de la molécule avec un récepteur. D'une part, *Hansch et Deutsch (1966)* mettent en évidence des corrélations entre un ou plusieurs paramètres physicochimiques de la molécule (constante de *Hammett*, coefficients de partage) et une activité biologique. Mais ces études ne tiennent compte ni de récepteur, ni de métabolisme.

Les résultats ne sont statistiquement satisfaisants que par le truchement d'une multiplication du nombre des paramètres et d'une transformation mathématique des données. Il est difficile de ne pas avoir de corrélations dans ces conditions. D'autre part, l'approche qui consiste en une étude limitée aux interactions avec le récepteur, illustrée par les travaux de *Korenman (1969)*, ne tient aucun compte de tout ce qui précède cette interaction, c'est-à-dire, distribution, métabolisme, diffusion membranaire. Elle ne peut conduire qu'à déterminer la spécificité et la géométrie du site de fixation à partir de l'empreinte déterminée par le substrat dont structure et conformation sont connues avec précision.

Par contre, *Ariens (1969)* propose un schéma pour le mécanisme d'action d'un produit dans lequel deux types de conditions chimiques peuvent être différenciés : les conditions essentielles pour l'activité biologique, qui sont celles nécessaires pour induire l'effet du produit au niveau du site d'action ; les conditions déterminant la pharmacocinétique du produit, qui interviennent pour sa fixation, sa distribution, et son élimination du système multicompartimental impliqué. Ces conditions ne peuvent s'étudier que dans des expériences *in vivo*.

C'est conformément à ce schéma, que les résultats obtenus dans la deuxième partie sont utilisés pour répondre à deux questions :

- L'interaction avec une protéine tissulaire est-elle un système tout ou rien, l'absence d'interaction se traduisant par l'absence de réponse biologique et inversement ?
- Les protéines plasmatiques peuvent-elles moduler la réponse biologique ?

1ère PARTIE

ANALYSE QUANTITATIVE DES INTERACTIONS
STEROIDES - PROTEINES

Dans cette première partie la mesure précise des paramètres des interactions stéroïdes-protéines est étudiée. Deux points sont traités successivement, d'une part les techniques utilisées pour mesurer à l'équilibre la quantité de stéroïde liée et la quantité libre, et d'autre part la représentation des résultats et la détermination des paramètres. Des exemples d'interactions entre stéroïdes hormonaux et protéines sont donnés dans un troisième chapitre pour illustrer la méthode.

1ER CHAPITRE

TECHNIQUES DE MESURES (*)

L'interaction met en jeu deux molécules très différentes : le stéroïde, petite molécule avec une structure essentiellement rigide, et la protéine, beaucoup moins stable, se dénaturant facilement et sensible à la température.

Il est nécessaire de vérifier que le stéroïde est soluble aux concentrations utilisées et n'est pas chimiquement transformé par le milieu. L'interaction peut provoquer un changement de conformation de la protéine, changement que l'on peut éventuellement étudier par la modification du spectre d'absorption (UV), du dichroïsme circulaire, etc... Si cette variation permet de mettre en évidence des changements de conformation, son amplitude est généralement trop faible pour évaluer la quantité du stéroïde fixé sur la protéine. Dans la majorité des cas, le marquage radioactif du stéroïde permet la détermination de la fraction liée ou libre, après leur séparation. En raison de la faible concentration des sites de liaison spécifique, la mesure de l'interaction doit se faire à des concentrations en stéroïdes que seule une activité spécifique élevée permet d'atteindre. C'est pourquoi le marquage radioactif par réduction au tritium est utilisé. Il ne modifie

(*) Partiellement extrait de "Measurement of Steroid Binding Proteins" E.E. Baulieu, J.P. Raynaud et E. Milgrom (1970a) dans Steroid Assay by Protein Binding "2nd Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology". E. Diczfalussy, Ed. Acta Endocrinol. Suppl. 147, 104.

généralement pas les caractéristiques chimiques du ligand et permet d'atteindre de très grandes activités spécifiques. Si la stabilité chimique du stéroïde permet de le chromatographier dans différents systèmes (C.C.M. colonnes, papier), il est beaucoup plus difficile d'obtenir des macromolécules purifiées. Ainsi beaucoup d'expériences se font à partir d'extraits protéiques ou partiellement purifiés.

Différentes techniques permettent de repérer une protéine liante dans un extrait non purifié et d'éviter l'altération en agissant sur la température et sur la durée de l'incubation nécessaire pour atteindre l'équilibre. Le choix de l'une de ces techniques dépend de l'information recherchée : index de liaison, nombre de sites, constante intrinsèque d'association, constantes de vitesse. Ces techniques sont étudiées, comparées, et classées en deux catégories : celles qui ne modifient pas l'équilibre et celles qui le modifient.

I - TECHNIQUES NE MODIFIANT PAS L'EQUILIBRE

1/ Dialyse à l'équilibre

Introduite pour les stéroïdes par *Schellman, Lumry et Samuels (1954)*, la dialyse à l'équilibre, malgré l'apparition de nouvelles techniques, demeure très utilisée comme technique de référence. Basée sur le principe de la diffusion sélective des molécules de petit volume à travers une membrane semi-perméable, cette technique permet de mesurer le stéroïde libre d'une part et le stéroïde lié d'autre part. En effet, le stéroïde libre diffuse librement à travers la membrane, et, après le temps nécessaire à l'établissement de l'équilibre, se trouve en concentration égale des deux côtés, tandis que le complexe stéroïde-protéine est retenu d'un côté. Il est possible au moyen d'une analyse mathématique, de détecter et de différencier les différentes protéines liantes présentes dans le mélange. Malgré la lenteur de la diffusion du stéroïde à travers la membrane, se traduisant par un temps d'équilibre relativement long (16 à 72 heures), la dialyse à l'équilibre est choisie dans les expériences décrites si les protéines ne sont pas altérées pendant l'expérience. Standardisée, elle donne en effet des résultats très précis (moins de 3 % de variation).

La dialyse à l'équilibre est modifiée par certains auteurs pour répondre à des cas particuliers :

Daughaday, Kozak et Biederman (1959a) utilisent deux sacs dans la même solution externe (dialyse à l'équilibre double) et *Westphal, Ashley et Selden (1961a)* utilisent la dialyse multiple à l'équilibre. De cette façon, plusieurs composés de haut poids moléculaire contenus dans des sacs individuels interagissent simultanément avec le même stéroïde placé dans la solution externe commune à tous les sacs. *Daughaday, Adler, Kozak-Mariz et Rasinski (1962)* mesurent la capacité de liaison de la transcortine en dialysant du plasma chauffé et non chauffé placé dans deux sacs de dialyse en contact avec la même solution externe. Pour éliminer dans un mélange de protéines plasmatiques l'influence de l'albumine, *Slaunwhite et Sandberg (1959)* placent de l'albumine à l'extérieur du sac. Cette technique exclut toute détermination des paramètres "vrais" de la liaison, car si la quantité de stéroïde lié à la protéine est mesurable, la quantité de stéroïde libre est inconnue.

Le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre nécessite plusieurs heures. Pour le réduire, dans une technique proche de la dialyse, *Pearlman et Crépy (1967a)* remplacent la membrane semi-perméable de séparation par un gel (Sephadex). Les tubes contenant le gel, le stéroïde, les protéines et le tampon sont agités une heure puis laissés reposer pendant une heure. Les complexes stéroïde-protéine sont exclus du gel et restent dans la phase externe tandis que le stéroïde libre se partage entre les phases externe et interne du gel. En mesurant le coefficient de partage du stéroïde entre les deux phases (à température et pH constants) et en admettant qu'il est, dans les limites de concentrations étudiées, indépendant des concentrations de stéroïdes et de protéines, les fractions libre et liée sont déterminées. Si cette technique est beaucoup plus rapide que la dialyse, elle est très imprécise. En effet, le coefficient de partage calculé est loin de sa valeur théorique : le Séphadex n'est pas inerte et peut fixer le stéroïde qui peut également s'adsorber sur les parois du tube. Comme le stéroïde lié est calculé par différence, toutes les adsorptions sont imputées à ce dernier, ce qui rend la mesure imprécise. *Heyns, Van Baelen et De Moor (1967)* utilisent

pour fixer le stéroïde libre des adsorbants qui entrent en compétition avec la protéine liante. Ces auteurs mesurent la constante d'adsorption du stéroïde pour l'adsorbant et étudient ensuite l'équilibre entre le complexe stéroïde-adsorbant, le stéroïde libre et le complexe stéroïde-protéine. Si la concentration de l'adsorbant est élevée, par rapport à celle de la protéine, le stéroïde est presque entièrement fixé sur cet adsorbant, ce qui peut permettre par exemple, d'éliminer les stéroïdes endogènes. Une concentration plus faible d'adsorbant permet d'adsorber uniquement le stéroïde libre. Enfin, dans des conditions très précises où la constante d'adsorption est connue, l'adsorbant est choisi afin que protéine et adsorbant aient la même importance. La quantité de stéroïde adsorbé, mesurée par la diminution de la concentration du stéroïde, est reliée quantitativement à la concentration de stéroïde libre et permet donc de la calculer dans la mesure où un nouvel équilibre est atteint. Cette technique, qui peut être considérée comme une technique à l'équilibre semblable à celle de *Pearlman et Crepy (1967a)* doit être préférée à la précédente pour des analyses quantitatives. Cependant, le choix de l'adsorbant est difficile : il doit être inerte vis à vis de la protéine et du stéroïde, et sa constante d'adsorption doit être bien déterminée. Par exemple, le Florisil tombe rapidement au fond du tube et son adsorption diminue ainsi irrégulièrement ; quant à la terre de Fuller, ses isothermes d'adsorption sont mal connus.

Enfin *Colowick et Womack (1969)* proposent une technique rapide pour la détermination des paramètres de la liaison basée sur la mesure de la vitesse de dialyse du substrat radioactif à travers une membrane de dialyse. Cette mesure se fait dans une cellule de dialyse comportant une chambre supérieure qui contient le complexe, séparée, par une membrane, d'une chambre inférieure dans laquelle le tampon circule à une vitesse constante. Bien que très rapide, cette technique nécessite un système de détection très sensible, car la quantité de substrat passant de la chambre supérieure dans la chambre inférieure est très faible. Les activités spécifiques actuellement disponibles ne permettent pas de ce fait de calculer des constantes d'association supérieures à 10^{+7} M^{-1} par cette technique.

2/ Ultrafiltration

Dans l'ultrafiltration, *Sandberg, Slaunwhite et Antoniades* (1957), le stéroïde préalablement incubé avec la solution protéique est placé d'un côté d'une membrane semi-perméable. Sous l'action d'une force appliquée par centrifugation ou par le vide, le stéroïde libre peut seul traverser la membrane et est mesuré sur un ultrafiltrat de 1/10 du volume initial afin de ne pas perturber pratiquement l'équilibre.

Cette technique est rapide et peut être utilisée à 37°C sans grands risques de dénaturation des protéines. *Forest, Rivarola et Migeon* (1968) montrent que les résultats obtenus sont identiques à ceux de la dialyse mais il est difficile d'appliquer cette technique sur une grande échelle car elle nécessite des chambres d'ultracentrifugation, *Toribara, Terepka et Dewey* (1957) ou un appareillage spécial *Lavietes* (1937), *Blatt, Robinson et Bixler* (1968). Les problèmes d'adsorption ne sont pas résolus et de plus si une impureté radiochimique est présente les résultats deviennent imprécis.

3/ Solubilité et partage

La liaison du stéroïde avec une protéine augmente sa solubilité dans une solution aqueuse. *Bischoff et Pilhorn* (1948), *Eik-Nes, Schellman, Lumry et Samuels* (1954) comparent la solubilité des stéroïdes dans une solution aqueuse contenant ou non des protéines. Cette technique permet seulement d'estimer, d'une manière semi-quantitative, les forces de liaison. Les auteurs montrent notamment que les forces de liaison sont inversement proportionnelles au nombre de groupes polaires de la molécule, ces derniers augmentant la solubilité dans l'eau.

D'autre part, *Alfsen* (1963) dissout le stéroïde (testostérone) dans de l'heptane et calcule son coefficient de partage entre l'heptane et une solution aqueuse de sérum albumine. Dans un premier temps, le coefficient de partage entre l'heptane et le tampon est déterminé. La différence entre ces deux mesures permet de déduire la quantité de stéroïde liée à la protéine. Mais la méthode de partage est faussée par l'action propre de l'heptane sur le sérum albumine.

4/ Spectrophotométrie

Westphal (1957) détermine l'influence des protéines (albumine) sur les coefficients d'extinction des stéroïdes (3 oxo Δ 4 stéroïdes) dans l'ultraviolet. La force de l'interaction stéroïde-protéine est proportionnelle à la différence, pour la longueur d'onde d'absorption maximum du stéroïde dans le tampon phosphate, entre deux coefficients d'extinction : celui du stéroïde pur et celui du stéroïde en présence de protéine. Cette technique bien qu'imprécise permet à *Westphal* (1961b) de montrer la proportionnalité inverse, entre la constante d'affinité des stéroïdes pour l'albumine et le nombre de groupements polaires dans la molécule du stéroïde, (règle des polarités). *Ryan* (1968) reprend la technique de *Westphal* (1961b) en étendant la mesure à tout le spectre ultraviolet. Il observe ainsi les perturbations dues à l'interaction protéine-stéroïde des bandes d'absorption dans l'ultraviolet, de la protéine pure ou du stéroïde pur, et analyse les spectres de différences, car ceux-ci montrent des images beaucoup plus nettes de ces perturbations que les spectres modifiés, *Scheraga* (1961).

Une autre technique spectrophotométrique est utilisée pour étudier la liaison stéroïde-protéine : la mesure d'atténuation de la fluorescence. Bien que l'interaction ne se traduise pas nécessairement par une modification de la fluorescence, puisque les acides aminés fluorescents ne sont pas forcément impliqués dans la liaison, ni localisés sur le site de liaison, il est vraisemblable que si la fluorescence change, l'interaction s'est produite. *Wang, Kawahara et Talalay* (1963) observent que la 19 nortestostérone atténue la fluorescence de la 3-oxo- Δ 5-stéroïde isomérase. *Abelson, Depatie et Craddock* (1960) montrent la formation d'un complexe entre tryptophane ou tyrosine et testostérone, tandis qu'*Oyakawa et Levedahl* (1958) suggèrent que la tyrosine est impliquée dans la liaison de la testostérone à l'albumine. Par la suite, *Steiner, Roth et Robbins* (1966) utilisent cette technique pour l'étude de la liaison tyrosine-sérum albumine et *Attallah et Lata* (1968) l'appliquent aux interactions stéroïdes-protéines. Plus rapide

et aussi précise que la dialyse à l'équilibre, elle ne nécessite que de faibles quantités de protéines. Elle est d'un grand intérêt pour l'étude des interactions où la quantité de protéine liante est faible, à la seule condition que l'interaction se traduise par une modification de la fluorescence.

II - TECHNIQUES MODIFIANT L'EQUILIBRE

1/ Colonnes de Séphadex

La séparation des macromolécules et des petites molécules par filtration sur des gels de dextran (Séphadex) est introduite dans le domaine des stéroïdes par *De Moor, Heirwegh, Heremans et Decklerk-Raskin (1962)*. Le stéroïde fixé par la protéine est élué rapidement à travers le gel, tandis que le stéroïde libre y est retenu. Mais au fur et à mesure que le complexe stéroïde-protéine descend dans la colonne, il se dissocie, car il n'est plus en équilibre avec le stéroïde libre qui diffuse dans le gel. Cette dissociation dépend d'une quantité de paramètres : constante d'association du complexe, volume et concentration en protéines de l'échantillon, diamètre et hauteur de la colonne, dilution dans la colonne, vitesse d'élu-tion, température. Malgré un bon contrôle de certains de ces paramètres, la quantité de stéroïde dissocié n'est pas déterminée avec une précision suffisante pour que la quantité de stéroïde fixé à l'équilibre puisse en être déduite (*Quincey et Gray (1963)*). Ce phénomène permet cependant de déceler, dans un mélange, une liaison à haute affinité, car les complexes de faible affinité se dissocient totalement au cours de la filtration. Cette technique, inutilisable pour une liaison de faible affinité, ne peut s'appliquer à la mesure quantitative des paramètres de la liaison d'une protéine caractérisée par une constante d'association intrinsèque élevée, que si des facteurs de correction sont introduits dans chaque cas particulier (*Raynaud, Labrie et Fortier (1964), Hoffman et Westphal (1969)*).

2/ Electrophorèse

Westphal, Firschein et Pearce (1955a) pour mesurer la fixation du cortisol et de la progestérone sur l'albumine, font migrer sur papier, sous l'action d'un champ électrique, la protéine en présence de faibles concentrations de ces stéroïdes. La progestérone migre avec l'albumine tandis que le cortisol reste pratiquement à l'origine. Cette technique est imprécise car le stéroïde peut se dissocier, s'adsorber sur le papier pendant la migration et de plus un flux électro-osmotique s'oppose à cette migration. Elle permet, cependant, de différencier un stéroïde faiblement lié qui ne migre pas, d'un stéroïde fortement lié qui migre avec la protéine, offrant ainsi la possibilité de mettre en évidence une protéine à forte affinité et de déterminer sa nature. Ainsi *Daughaday (1958a)* montre, en employant l'électrophorèse à flot continu sur papier, que la corticostérone migre avec une alphaglobuline.

Daughaday (1956a) met au point la technique d'électrophorèse sur papier à l'équilibre. La solution protéique est préalablement dialysée contre le tampon, le papier pour l'électrophorèse est ensuite trempé dans ce dialysat où la concentration en stéroïde libre est identique à celle de la solution protéique, puis la solution protéique est déposée sur le papier. La dissociation est ainsi limitée et le stéroïde reste partiellement fixé sur la protéine. La concentration de stéroïdes étant élevée, si une liaison spécifique est présente, elle risque d'être saturée et sa détection devient difficile.

3/ Ultracentrifugation

Les protéines caractérisées par des coefficients de sédimentation différents peuvent être séparées par un champ gravitationnel élevé (100 000 g) *Westphal (1955b)*. La liaison d'un stéroïde sur une protéine peut être ainsi suivie. Ici encore, les complexes se dissocient au cours de la centrifugation. Par contre, cette technique est intéressante pour la détection des fortes liaisons.

4/ Adsorbants

Ekins (1960) utilise la fixation spécifique de la thyroxine sur sa protéine de liaison plasmatique pour doser la concentration de thyroxine dans le plasma. Selon le même principe, *Yalow et Berson (1960)* mettent au point une technique de dosage de l'insuline, qui consiste à mesurer le déplacement de l'insuline marquée, préalablement fixée sur son anticorps, par de l'insuline froide. *Murphy (1964a)* montre qu'il est possible d'appliquer cette technique au dosage des stéroïdes, si l'on dispose du stéroïde marqué, d'une protéine le liant spécifiquement et d'une technique de séparation.

En 1964, *Herbert, Gottlieb, Lau et Wasserman* proposent une méthode simple et rapide pour séparer les grosses des petites molécules, par adsorption sélective de ces dernières sur le charbon activé enrobé de dextran. *Nugent et Mayes (1966)* dosent les corticostéroïdes en mettant en présence, suivant le principe de *Murphy (1964a)*, du plasma, qui contient une protéine de transport spécifique des corticostéroïdes, du cortisol ^{14}C , du charbon enrobé de dextran et le corticostéroïde à mesurer. Une étude détaillée de cette technique est faite par *Murphy (1967)*. Les adsorbants utilisés sont des silicates (Florisol, terre de Fuller, réactif de Lloyd) ou bien du charbon activé, seul, ou enrobé de dextran. Lorsque l'équilibre entre le complexe et le stéroïde libre marqué, est atteint, une certaine quantité d'adsorbant est ajoutée dans le tube, qui est agité et centrifugé. L'adsorbant fixe le stéroïde libre et il suffit de prélever un aliquot du surnageant qui contient uniquement le complexe stéroïde-protéine, pour déterminer, par la mesure de sa radioactivité, la quantité de stéroïde lié.

Cette méthode présente toutefois des inconvénients : si le stéroïde libre peut être fixé par l'adsorbant, il est évident que l'adsorbant va entrer en compétition avec les protéines liantes et détacher le stéroïde lié, et ceci d'autant plus que l'affinité pour la protéine liante est plus faible. Il peut, en outre, adsorber une partie des protéines. Pour ces raisons, cette technique ne peut être utilisée que si le choix de l'adsorbant, sa quantité et sa qualité, la durée de contact, la température, le pH, la durée et le mode d'agitation sont

rigoureusement contrôlés.

Milgrom et Baulieu (1969) incubent la solution protéique et le stéroïde avec du charbon enrobé de dextran à forte concentration, à basse température et en prolongeant la durée du contact, de sorte que le charbon adsorbe le stéroïde libre et compétitionne avec les protéines pour le stéroïde lié. Les complexes stéroïde-protéine de forte affinité se dissocient très lentement et, après un certain temps, leur dissociation apparente peut être suivie expérimentalement, puisque les autres complexes, de faible affinité, se sont déjà dissociés. La droite représentant la dissociation du complexe de forte affinité en fonction du temps, obtenue en coordonnées semi-logarithmiques, permet de déterminer, par extrapolation à l'origine, la concentration initiale de ce complexe. Si la concentration en stéroïdes est suffisamment grande pour saturer les sites de forte affinité, il est possible de déterminer par cette technique la concentration de ces sites dans un mélange de protéines.

5/ Précipitation

Pour le dosage de la testostérone plasmatique, *Mayes et Nugent (1968)* précipitent les complexes stéroïde-protéine par le sulfate d'ammonium. Ainsi, après centrifugation, le surnageant ne contient que le stéroïde libre. Cette technique permet donc de séparer stéroïde libre et stéroïde lié, mais la dissociation et l'adsorption sont, entre autres, des facteurs tout aussi difficiles à contrôler que dans les cas précédents.

La même technique ne peut être choisie pour le dosage des stéroïdes ou pour la détermination quantitative des paramètres de la liaison. Plutôt que de décrire les domaines d'application de ces différentes techniques, les interactions étudiées et le but recherché par différents auteurs sont représentés sur les tableaux de l'appendice 1.

2^{EME} CHAPITREREPRESENTATION GRAPHIQUE DE LA LIAISON ET DETERMINATION
DE SES PARAMETRES (*) (**)

Les problèmes fondamentaux des interactions ligand macromolécules sont analysés dans de nombreux ouvrages : *Scatchard (1949), Karush (1951), Klotz (1953), Edsall et Wyman (1958), Monod, Wyman et Changeux (1964), Wyman (1964), Hart (1965), Weber et Anderson (1965), Whitehead (1965), Atkinson (1966), Koshland, Nemethy et Filmer (1966), Kirthley et Koshland (1967), Barber, Welch et Mackay (1967), Ekins, Newman et O'Riordan (1968), Rodbard, Rayford, Cooper et Ross (1968)*. Toutefois, les méthodes courantes d'analyse de la liaison ne sont pas toujours parfaitement adaptées aux situations complexes correspondant au cas où plusieurs protéines liantes (dont certaines ont une capacité de liaison élevée) sont présentes dans un mélange ; d'où la nécessité de développer une méthodologie différente. *Peterson, Nokes, Chen et Black (1960), Yates et Urquhart (1962), Tait et Burstein (1964), Labrie, Normand, Raynaud et Fortier (1965), Kilroe-Smith (1966), Rosenthal (1967), Snart (1969), Pearlman (1970)*.

(*) Ce chapitre est extrait de : A "proportion Graph" "Method for Measuring Binding Systems" J.P. Raynaud 1970a dans : *Frontiers of Nuclear Medicine*, Horst Ed. Springer Verlag.

(**) Une étude plus détaillée comprenant en particulier l'analyse mathématique et statistique des différents cas possibles et le traitement par ordinateur des résultats est publié dans *Eur. J. Biochem.* 13 (1970b) 293, E.E. Baulieu et J.P. Raynaud.

I - GENERALITES

Les protéines possédant une FORTE AFFINITE, un NOMBRE DE SITES LIMITE, une HAUTE SPECIFICITE pour le stéroïde sont appelées PROTEINES SPECIFIQUES "S" et les protéines qui, à l'inverse, ont une *faible affinité*, un *nombre de sites élevé* et *pas de spécificité* pour un stéroïde sont appelées *protéines non spécifiques* "NS".

Une nouvelle méthode graphique, "GRAPHIQUE PROPORTIONNEL", est développée afin de déterminer le nombre de sites et la constante d'association intrinsèque d'un ou de deux systèmes de liaison spécifique S, en présence ou en absence d'un système de liaison non spécifique NS.

En admettant que :

- 1/ les systèmes de liaison sont indépendants,
- 2/ tous les sites d'un même système sont identiques,
- 3/ il n'y a pas d'effet coopératif,
- 4/ les protéines n'affectent pas l'activité du stéroïde si ce n'est par la liaison,
- 5/ chaque système obéit à la loi d'action de masse.

A l'équilibre, on peut écrire,

$$(B_i) = \sum_{i=1}^n \frac{(N_i) (U)}{1/K_i + (U)}$$

N représentant la concentration des sites, U le stéroïde libre, B le stéroïde lié, i l'indice de chaque système de liaison et K la constante d'association intrinsèque. Toutes les concentrations () sont données en moles/litre et K est exprimé en M^{-1} . Ni les concentrations de protéines, ni le nombre de sites par protéine, ne sont pris en considération, car ces derniers paramètres ne peuvent être calculés que si la protéine est purifiée et si son poids moléculaire est connu.

II - SYSTEMES DE LIAISON

1/ Cas d'une liaison spécifique "S"

L'équation de liaison s'écrit :

$$(B_S) = \frac{(N_S) (U)}{1/K_S + (U)}$$

Dans ce système simple, l'emploi de méthodes graphiques comme les inverses $\frac{1}{(B_S)}$ versus $\frac{1}{(U)}$ *Lineweaver-Burk* (1934), ou $\frac{(B_S)}{(U)}$ versus (B_S) , *Eadie* (1942) et *Scatchard* (1949) permet d'obtenir aisément les paramètres de la liaison à partir de droites. Toutefois, le "graphique proportionnel", quoique plus compliqué, est appliqué à ce cas, afin que son emploi ultérieur dans les situations plus complexes pour lesquelles cette représentation est plus utile, devienne plus simple à expliquer.

Posons $(T) = (B_S) + (U)$. Dans le "graphique proportionnel" les logarithmes de la fraction liée $b = \frac{(B_S)}{(T)}$ et de la fraction libre $u = \frac{(U)}{(T)}$, sont tracés en fonction du logarithme de la concentration totale (T) du stéroïde (fig. 1a).

L'emploi des logarithmes fait apparaître des caractéristiques intéressantes de la fonction. Il permet de représenter la liaison pour de grandes variations de la concentration du ligand ainsi que d'élargir à volonté l'échelle de l'axe des ordonnées pour mieux visualiser le phénomène.

Quand (T) atteint et dépasse une valeur suffisante pour que tous les sites N_S soient occupés, $(B_S) \rightarrow (N_S)$, $b \rightarrow \frac{(N_S)}{(T)}$ et par conséquent $\log b \rightarrow \log \frac{(N_S)}{(T)}$ ou $\log b \rightarrow \log (N_S) - \log (T)$, c'est-à-dire que lorsque T augmente $\log b_S$ a pour asymptote une droite de pente -1 et d'abscisse $\log (N_S)$.

Quand $(U) \rightarrow 0$, d'après l'équation de liaison, $\frac{(B_S)}{(U)} \rightarrow K_S (N_S)$ et $\log \frac{(B_S)}{(U)} = \log \frac{b}{u} = \log b - \log u \rightarrow \log K_S (N_S)$.

Par la construction de l'asymptote de $\log b$, $\log (N_S)$ est évalué et par la différence pour les faibles valeurs de T entre $\log b$ et $\log u$, $\log K_S (N_S)$ est mesuré et par conséquent K_S calculé. K_S est estimé avec précision si un plateau existe pour les faibles valeurs de (T) , c'est-à-dire si l'activité spécifique du ligand permet d'obtenir des concentrations de $(U) \ll 1/K_S$. Pour des valeurs élevées de K_S , l'activité spécifique du stéroïde doit donc être très élevée.

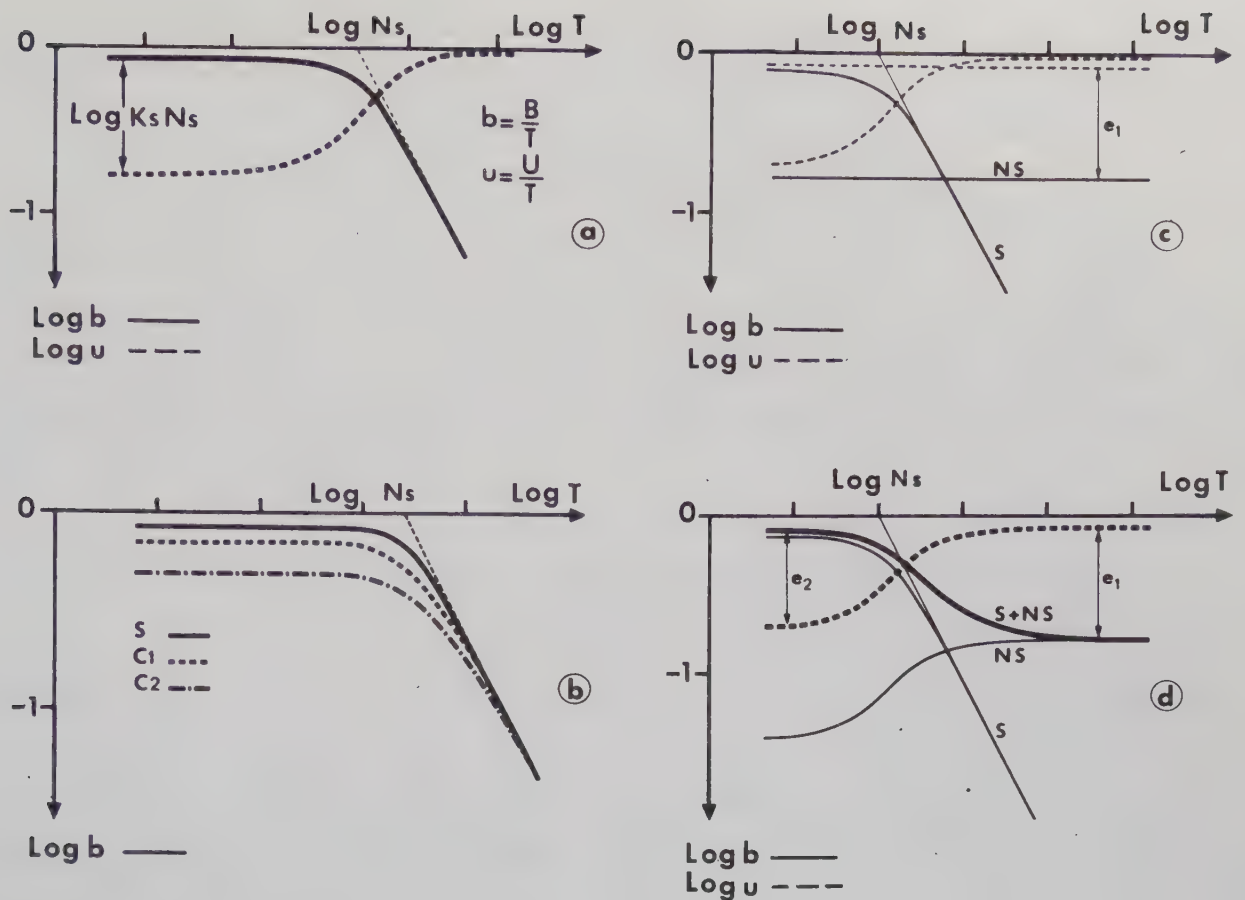


Fig. 1 - REPRESENTATION DE LA LIAISON PAR LE GRAPHIQUE PROPORTIONNEL

a - Courbe de liaison spécifique S.

b - Graphique proportionnel de la liaison compétitive d'un compétiteur C pour une liaison spécifique S.

La courbe S représente la liaison du ligand en absence de compétiteur. Les courbes C₁ et C₂ représentent la liaison du même ligand en présence de deux concentrations différentes de compétiteur.

c - Système de liaison spécifique S et non spécifique NS.

d - Graphique proportionnel de la liaison d'un ligand dans un mélange comprenant à la fois une liaison spécifique S et une liaison non spécifique NS.

Décomposition de la courbe S + NS en ses deux composantes. La courbe de liaison non spécifique n'est plus une droite.

Etudes de compétition

Si des quantités croissantes de compétiteur sont ajoutées à une quantité fixe de stéroïde, la quantité de stéroïde lié diminue. Si la concentration du compétiteur est élevée, le stéroïde peut être complètement déplacé de son site.

La constante d'affinité intrinsèque, du compétiteur K_C , est obtenue à partir du calcul de la constante K_S par la méthode décrite et de la détermination de la constante apparente d'association du stéroïde, K_{app} , en présence d'une concentration (C) de compétiteur. D'après *Edsall et Wyman (1958)*,

$$K_C = (K_S/K_{app} - 1) \times \frac{1}{(C)}.$$

Le résultat est vérifié pour différentes concentrations de compétiteur. Les courbes de compétition sont représentées sur la fig. 1b. La valeur de la constante K_C peut être calculée directement par la première méthode, si l'on dispose d'un compétiteur radioactif. Dans ce cas, le rapport de la concentration des sites de liaison pour le compétiteur et pour le stéroïde doit être un nombre RATIONNEL. Un rapport différent de 1, signifie que la protéine possède plus de sites de liaison pour l'un que pour l'autre.

2/ Cas d'une liaison non spécifique "NS"

Si la liaison suit la loi d'action de masse

$$(B_{NS}) = \frac{(N_{NS}) \times (U)}{1/K_{NS} + (U)} = K_{NS} (U) [(N_{NS}) - (B_{NS})]$$

La liaison non spécifique se caractérise par une faible constante d'affinité et une grande concentration de sites de liaison. D'après l'équation précédente, si K_{NS} est faible ($\frac{1}{K_{NS}} \gg U$), et/ou si (N_{NS}) est grand, (B_{NS}) est beaucoup plus petit que (N_{NS}) et par conséquent :

$$(B_{NS}) \approx K_{NS} (N_{NS}) (U)$$

(B_{NS}) est donc proportionnel à (U) comme dans le cas d'un système de partage ayant pour coefficient $K_{NS} (N_{NS})$.

La représentation sur le "graphique proportionnel" de $\log b$ (ou de $\log u$) = f (log (T)) est une parallèle à l'axe des abscisses (fig. 1c) et $\log K_{NS} (N_{NS})$: "e₁", est déduit de

$\log b - \log u$; cette valeur est indépendante de (T). Cette parallèle correspond à la tangente à l'origine de l'hyperbole traduisant la loi d'action de masse. En effet, dans le domaine des concentrations utilisées, la courbe peut s'identifier à cette tangente, car la solubilité du ligand ne permet pas d'obtenir les concentrations saturantes. La valeur $K_{NS} (N_{NS})$ peut être la somme de plusieurs liaisons non spécifiques d'affinité et de capacité différentes. Les études de compétition sont évidemment impossibles, car, vraisemblablement, les interactions non spécifiques se font en de nombreux points de la protéine.

3/ *Cas d'une liaison spécifique en présence d'une liaison non spécifique : système S + NS*

L'équation de liaison s'écrit pour ce système

$$(B) = (B_S) + (B_{NS}) = \frac{(N_S)(U)}{1/K_S + (U)} + K_{NS} (N_{NS}) (U)$$

La figure 1d représente la courbe de la fraction liée ($b = b_S + b_{NS}$) caractéristique d'un système S + NS. Cette courbe présente trois parties distinctes.

- Quand (T) est petit, b_{NS} est petit et $\log b$ se rapproche de $\log b_S$.

- Quand (T) est grand, b_S devient petit par rapport à b_{NS} et à la limite lorsque $(T) \rightarrow \infty$, $\log b$ devient asymptotique à $\log b_{NS}$.

- Entre ces deux limites, la courbe dépend de la contribution plus ou moins grande de $\log b_S$ et de $\log b_{NS}$, c'est-à-dire des valeurs relatives des K_i et des N_i .

La représentation de $\log b_{NS}$ n'est plus une ligne droite ; la liaison non spécifique diminue aux faibles concentrations du fait de la présence de la liaison spécifique, comme l'indique la comparaison entre le graphique 1c et 1d. $\log b$ n'a plus une pente de valeur -1, car $\frac{b_{NS}}{b_S}$ augmente avec (T).

Les paramètres du système S + NS, à savoir K_S , (N_S) et $K_{NS} (N_{NS})$ sont déterminés de la façon suivante :

Considérons les limites de $\log b - \log u$ quand $(T) \rightarrow \infty$ et $(T) \rightarrow 0$.

$$\lim_{(T) \rightarrow \infty} \log b - \log u = \log K_{NS}(N_{NS}) \text{ ("e}_1\text{" fig. 1d)}$$

$$\lim_{(T) \rightarrow 0} \log b - \log u = \log (K_S(N_S) + K_{NS}(N_{NS})) \text{ ("e}_2\text{" fig. 1d)}$$

A partir de ces limites, $K_S(N_S)$ et $K_{NS}(N_{NS})$ sont déterminés. K_S est ensuite obtenu d'une manière graphique.

On peut par exemple chercher l'abscisse du point d'intersection de la fonction $\log b = f(\log T)$ par une droite d'équation $\log b = \text{Cte}$. Cette constante doit permettre une intersection précise. Cette condition est remplie pour la valeur de (U) correspondant à la demi-saturation de la liaison spécifique, c'est-à-dire lorsque $U = \frac{1}{K_S}$, soit :

$$\log b = \log \frac{K_S(N_S)/2 + K_{NS}(N_{NS})}{K_S(N_S)/2 + K_{NS}(N_{NS}) + 1},$$

équation d'une droite qui coupe $\log b = f(\log (T))$ en un point dont l'abscisse est

$$\log \frac{1}{K_S} [K_S(N_S)/2 + K_{NS}(N_{NS}) + 1]$$

K_S est déduit de cette équation. (N_S) est alors calculé à partir de la valeur de $K_S(N_S)$, déterminée précédemment.

On peut également déduire de la courbe $\log u$ en fonction de $\log (T)$, la courbe $\log b_{NS}$ par une translation de valeur $K_{NS}(N_{NS})$; (e₁). Puis en soustrayant les valeurs de b_{NS} des valeurs de b , on obtient les valeurs de b_S , qui permettent de tracer la courbe $\log b_S$ en fonction de $\log (T)$. K_S et N_S sont déduits de la courbe comme pour une liaison spécifique "S".

La possibilité de détecter une liaison spécifique en présence d'une liaison non spécifique, dépend des valeurs relatives de $K_S(N_S)$ et $K_{NS}(N_{NS})$ (voir fig. 2a), c'est-à-dire que le

rapport $\frac{K_S(N_S)}{K_{NS}(N_{NS})}$ doit être le plus grand possible.

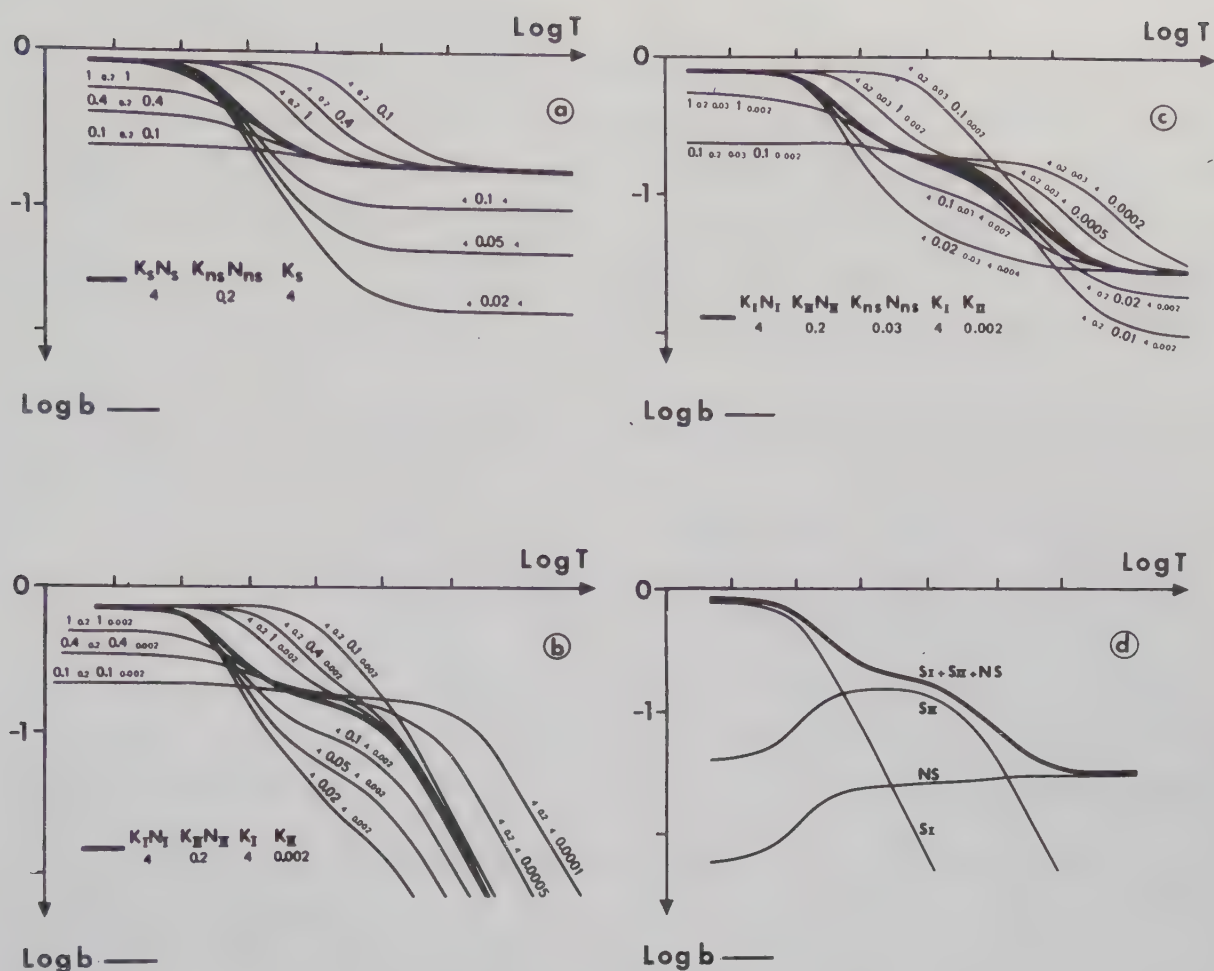


Fig. 2 - INFLUENCE DES PARAMETRES DE LA LIAISON SUR LA FORME DES COURBES

Les paramètres indiqués en légende de chaque figure correspondent à la courbe en trait épais. Sur chaque courbe en trait fin, les paramètres sont indiqués en mettant en évidence, par une grandeur supérieure des chiffres, le paramètre qui a été modifié.

a - Courbes théoriques pour un système $S + NS$.

Influence des paramètres sur la forme de la courbe.

b - Courbes théoriques pour un système $S_I + S_{II}$.

Les valeurs des paramètres modifient la forme de la courbe qui peut dans certains cas être assimilée à un système S ou $S + NS$.

c - Courbes théoriques pour un système $S_I + S_{II} + NS$.

Les valeurs des paramètres changent la forme de la courbe qui dégénère dans les systèmes plus simples.

d - Décomposition de la courbe de liaison pour un système $S_I + S_{II} + NS$ en ses trois composantes.

A chaque valeur de la concentration du ligand, il est possible de calculer la liaison relative sur chaque protéine.

Etudes de compétition

Comme dans le cas précédent, la compétition de différents ligands, pour les sites de liaison non spécifiques, ne peut s'observer. Cependant, la compétition pour les sites spécifiques, malgré la présence de liaison non spécifique, donne une constante d'association apparente, à partir de laquelle la constante intrinsèque d'association du compétiteur est calculée.

4/ Cas de deux liaisons spécifiques en présence :

système $S_I + S_{II}$

$$(B) = (B_{S_I}) + (B_{S_{II}}) = \frac{(N_{S_I}) (U)}{1/K_{S_I} + (U)} + \frac{(N_{S_{II}}) (U)}{1/K_{S_{II}} + (U)}$$

Les deux limites de $\log b$ et (B) lorsque $(T) \rightarrow 0$ et $(T) \rightarrow \infty$ sont utilisées pour la détermination des 4 paramètres, K_{S_I} , (N_{S_I}) , $K_{S_{II}}$, $(N_{S_{II}})$, par une analyse de régression effectuée sur la partie médiane de la courbe. Cette analyse est détaillée dans l'appendice 2.

Dans ce cas, les valeurs limites sont :

$$\lim_{(T) \rightarrow 0} \log b - \log u = K_{S_I} (N_{S_I}) + K_{S_{II}} (N_{S_{II}})$$

$$\lim_{(T) \rightarrow \infty} (B) = (N_{S_I}) + (N_{S_{II}})$$

La fig. 2b représente des courbes théoriques tracées à partir de paramètres arbitraires. D'après ces courbes, c'est seulement dans certaines conditions que les deux types de liaison sont différenciés.

Les études de compétition sont ici difficiles, car la mise en évidence d'une compétition sur l'une ou l'autre des deux protéines spécifiques dépend du rapport $K_{S_I} (N_{S_I}) / K_{S_{II}} (N_{S_{II}})$ qui doit être élevée. De plus, si la valeur $K_{S_{II}} (N_{S_{II}})$ est trop faible, la mise en évidence d'une compétition sur S_{II} dépend de la précision dans l'évaluation de ce paramètre.

5/ Cas de deux liaisons spécifiques et d'une liaison non spécifique en présence : système $S_I + S_{II} + NS$

$$(B) = (B_{S_I}) + (B_{S_{II}}) + (B_{NS})$$

$$\text{soit } (B) = \frac{(N_{S_I}) (U)}{1/K_{S_I} + (U)} + \frac{(N_{S_{II}}) (U)}{1/K_{S_{II}} + (U)} + K_{NS}(N_{NS}) (U)$$

Cette situation n'est pas seulement une généralisation de la méthode, elle existe réellement (cf. Partie I, 3ème chapitre). Sur la figure 2c les courbes théoriques sont tracées à partir des mêmes paramètres que dans le système précédent, auxquels est ajoutée une valeur $K_{NS}(N_{NS})$ pour la liaison non spécifique. Pour certaines valeurs relatives des différents paramètres, la présence simultanée des trois types de liaison est facilement décelable à partir de la courbe. Les limites pour $(T) \rightarrow \infty$ et $(T) \rightarrow 0$ de $\log b - \log u$ permettent de calculer $K_{NS}(N_{NS})$ et $K_{NS}(N_{NS}) + K_{S_I}(N_{S_I}) + K_{S_{II}}(N_{S_{II}})$ tandis qu'après soustraction de la partie correspondant à la liaison non spécifique, selon le procédé décrit pour le système $S + NS$, la limite de (B) lorsque $(T) \rightarrow \infty$ permet d'estimer $(N_{S_I}) + (N_{S_{II}})$. Par régression comme dans le système $S_I + S_{II}$, tous les paramètres sont ensuite calculés. Pour certaines valeurs relatives des différents paramètres, ce système peut dégénérer en des systèmes tels que $S_I + S_{II}$ ou $S + NS$ ou même S .

III - ANALYSE MATHEMATIQUE ET STATISTIQUE

Cette méthode graphique permet d'obtenir une première estimation, à 10 % près environ, de la valeur des paramètres de la liaison K_i et N_i .

Par analyse mathématique et statistique de la fonction $\frac{(B)}{(U)} = f(U)$, ces paramètres sont calculés plus précisément. L'ensemble de ces analyses est détaillé dans l'appendice 3 ainsi que leur programmation et des exemples théoriques d'entrée/sortie ordinateur pour utilisation sur IBM 360 (appendice 4). Les paramètres des systèmes choisis pour ces exemples sont les mêmes que ceux des systèmes des exemples théoriques décrits, mais les points utilisés subissent des variations de $\pm (0 \text{ à } 10 \%)$ par rapport à leur valeur théorique.

D'après la forme de la courbe expérimentale, un système (S , $S + NS$, $S_I + S_{II}$ ou $S_I + S_{II} + NS$) est choisi, et les valeurs approximatives des paramètres sont déterminées. Le système est défini par une des équations théoriques précédemment décrites. Les valeurs numériques approximatives des paramètres du système choisi sont introduites dans cette équation théorique représentant une fonction non linéaire. La fonction est linéarisée par développement en série de Taylor. La courbe la mieux ajustée aux points expérimentaux est alors recherchée par itérations successives, en faisant varier à chaque itération la valeur des paramètres de cette courbe. Leur meilleure valeur est obtenue quand le critère des moindres carrés est satisfait. Puis, l'écart-type sur chaque paramètre est calculé, par une méthode matricielle, et la valeur de l'ajustement (variance résiduelle) est calculée par une analyse statistique. Box (1960), Wilkinson (1961), Bliss et James (1966), Cleland (1967), Hanson, Ling et Havir (1967), Haarhof (1969).

IV - DISCUSSION

Les méthodes classiques sont, en général, adaptées à l'étude de la liaison pour une protéine spécifique. Toutefois, la méthode des inverses, du fait de son principe, ne doit s'appliquer qu'en affectant les points expérimentaux d'un poids. Dans de nombreux cas, une liaison non spécifique et une liaison spécifique sont présentes simultanément. Ces méthodes ne conviennent plus, car la fonction est la somme de deux hyperboles. La linéarisation de cette fonction n'est théoriquement plus possible avec les coordonnées utilisées dans ces méthodes (voir fig. 3a et fig. 3b). Si une région étroite et linéaire de la courbe est sélectionnée, en dehors de cette région, la courbe n'est plus linéaire, la pente varie et les paramètres calculés, dépendant de la région choisie, sont donc arbitraires et peu précis. Par exemple, le paramètre $K_{NS}(N_{NS})$ de la liaison non spécifique, n'est pas calculable par la méthode des inverses car, (fig. 3a), les points correspondants à cette liaison sont tous regroupés à l'origine. En effet, $K_{NS}(N_{NS})$ n'est déterminé que lorsque les sites spécifiques sont saturés, c'est-à-dire,

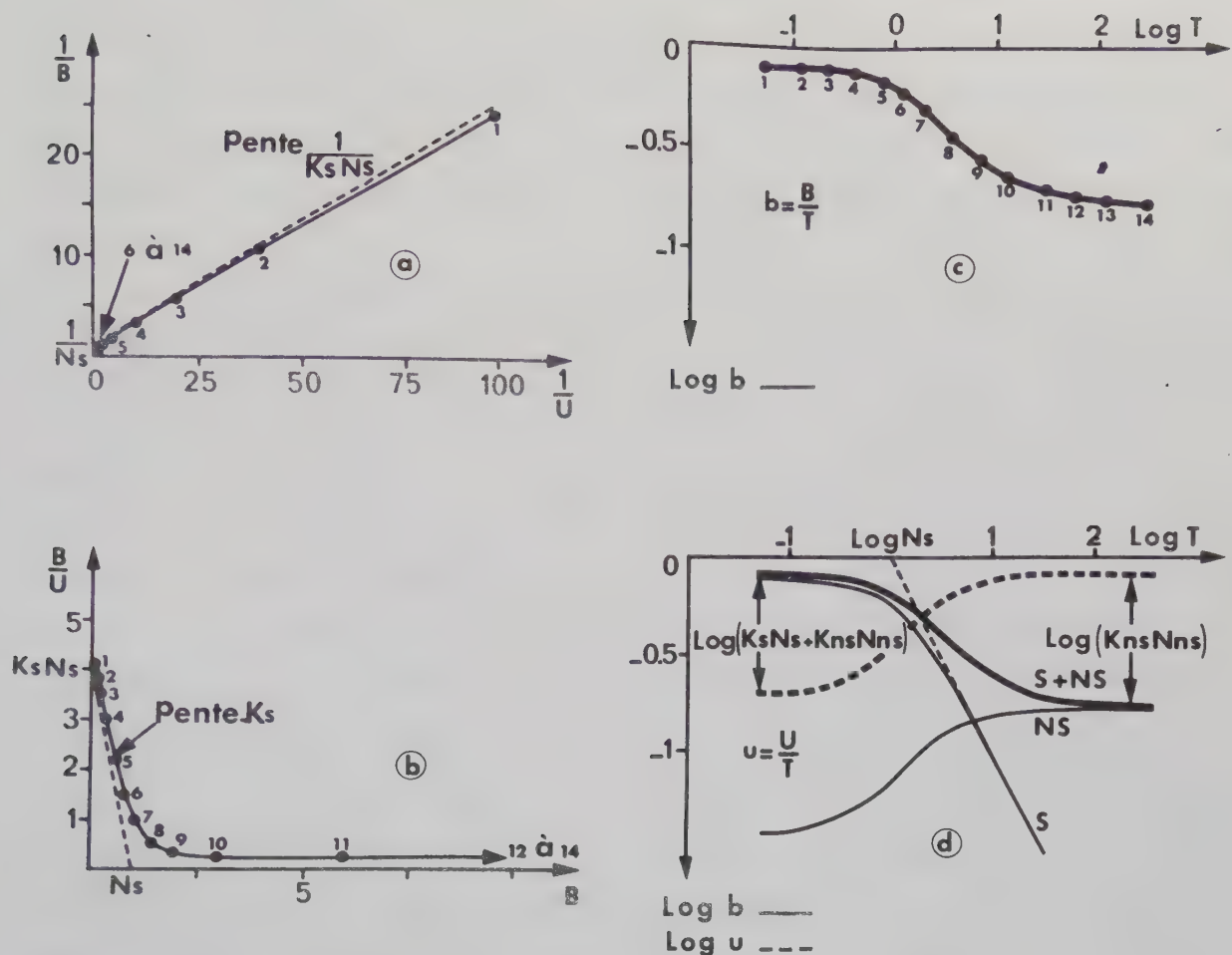


Fig. 3 - DIFFERENTES REPRESENTATIONS ET DETERMINATION DES PARAMETRES POUR UN SYSTEME S + NS

a - Représentation de $1/B$ vers $1/U$ (Lineweaver-Burk)

Tous les points à haute concentration (6 à 14) sont regroupés à proximité de l'origine. Cette méthode ne permet pas de mettre en évidence la liaison non spécifique.

b - Représentation de B/U vers B (Scatchard)

La fonction n'est plus une droite.

c - Représentation de $\log T$ vers $\log B/T$

Tous les points sont également espacés sur l'axe et l'ensemble du phénomène peut être analysé.

d - Détermination des paramètres de la liaison dans le graphique proportionnel.

A l'inverse des deux autres méthodes, la liaison non spécifique (paramètre $K_{NS} N_{NS}$) est calculée.

uniquement pour les fortes concentrations de ligand. La méthode de *Scatchard* (fig. 3b) ne permet pas non plus une évaluation précise de $K_{NS}(N_{NS})$ car, dans ce cas, les fortes concentrations de ligand lié ne peuvent pas être représentées dans les limites du graphique.

L'introduction des ordinateurs offre, maintenant, la possibilité d'envisager l'étude des fonctions non linéaires sur des bases différentes. Il n'est plus nécessaire de "linéariser" ces fonctions par des transformations de coordonnées, puisque l'emploi des développements en série permet une étude directe de fonctions non linéaires par ordinateur ainsi que le calcul de leurs paramètres.

La représentation graphique n'a donc pour objet que de visualiser le phénomène et de calculer approximativement les paramètres des systèmes de liaison, qui sont ensuite évalués avec précision par ordinateur. Le "graphique proportionnel" atteint cet objectif dans la mesure où l'utilisation des échelles logarithmiques permet de représenter aisément la courbe de liaison dans un domaine très large de concentrations (fig. 3c) et d'étudier la fraction libre/total ou lié/total en fonction de la concentration totale du ligand. L'absence de liaison non spécifique est indiquée par une droite de pente -1 lorsque la concentration totale du ligand augmente. L'intérêt de cette méthode réside surtout dans son application à des systèmes de liaison plus complexes. La décomposition de la courbe de liaison totale en plusieurs courbes caractérisant chacune un système de liaison simple, dont un exemple est donné pour un système $S_I + S_{II} + NS$ (fig. 3d) et un système $S + NS$ (fig. 2d), indique le degré de participation de chaque type de liaison, pour toutes les concentrations du ligand.

Enfin, cette méthode se révèle très utile pour suivre la purification d'une protéine (cf. Partie I, 3ème chapitre). En effet, un système très complexe au début tend vers un système plus simple au fur et à mesure de la purification ; un système S ou, si deux sites sont présents sur la même protéine, un système $S_I + S_{II}$. Dans ce dernier cas, quel que soit le degré de purification, le rapport $N_{S_I}/N_{S_{II}}$ reste constant.

3EME CHAPITRE

EXEMPLES D'INTERACTIONS ENTRE STEROIDES HORMONAUX ET PROTEINES

La méthode graphique décrite est utilisée, pour la détermination des interactions entre stéroïdes hormonaux et protéines, dans des milieux complexes comme le plasma ou les organes cibles.

La quantité libre et la quantité liée sont mesurées par la dialyse à l'équilibre, technique la plus appropriée pour une évaluation précise des paramètres de la liaison. Un sac à dialyse de 1,5 ml contenant la protéine est placé dans un récipient contenant 15 ml de tampon phosphate 0,1M pH 7,4 dans lequel est dissout le stéroïde. A l'équilibre : (T) étant la concentration de stéroïde total à l'intérieur du sac, (B) la concentration de stéroïde lié dans le sac, (U) la concentration de stéroïde libre à l'intérieur ou à l'extérieur du sac, on a $(T) = (B) + (U)$. Pour une meilleure précision de comptage, la même quantité (a) de stéroïde radioactif est employée pour chaque point expérimental et placée initialement dans le compartiment externe. A l'équilibre, (a) devient (α) dans le sac de dialyse. La concentration du stéroïde peut être augmentée par dilution isotopique, c'est-à-dire, en ajoutant à la solution initiale différentes concentrations (A) de stéroïdes non radioactifs, devenant à l'équilibre ($\mathcal{A}$) dans le sac. Connaissant l'activité spécifique $\frac{(*a)}{(a) + (A)}$ et la radioactivité dans le sac ($*\alpha$), la concentration totale dans le sac $(T) = (\alpha) + (\mathcal{A})$ est calculée à partir de :

$$\frac{(*a)}{(a) + (A)} = \frac{(*\alpha)}{(\alpha) + (\mathcal{A})}$$

(*) Radioactif

La concentration en stéroïde libre et lié est exprimée par rapport à la concentration en stéroïde total (T).

$$b = \frac{(B)}{(T)} \text{ et } u = \frac{(U)}{(T)}$$

Dans le cas de stéroïdes radioactifs b et u sont obtenus directement par la mesure de la radioactivité

$$b = \frac{(*B)}{(*\alpha)} \text{ et } u = \frac{(*U)}{(*\alpha)}$$

Pour obtenir tous les points d'une courbe, dans les mêmes conditions expérimentales, un appareil de dimension réduite permettant 86 dialyses simultanées est utilisé.

Dans ces études d'interactions la dilution des solutions protéiques est un point très important. *Edsall et Wyman (1958)* proposent de vérifier les mesures des paramètres de la liaison en diluant la solution protéique. La constante intrinsèque d'association ne doit pas changer et la concentration des sites doit être proportionnelle à la dilution. D'autre part à 4°C, la liaison est souvent très élevée (>95%), la détermination du rapport lié/libre devient très imprécise et il est nécessaire de diluer la solution protéique.

Mais *Brunkhorst et Hess (1965)* notent un effet de la dilution sur les paramètres de l'interaction des stéroïdes avec l'albumine. *Keller, Sendelbeck, Richardson, Moore et Yates (1966)* généralisent ce concept aux interactions stéroïdes-protéines et écrivent que la dilution est gênante pour interpréter la distribution des stéroïdes dans des échantillons plasmatiques. *Karush et Sonenberg (1949)*, *Karush (1950)*, et *Brunkhorst et Hess (1965)* mentionnent le caractère très particulier et pratiquement unique de l'interaction albumine-stéroïdes. Dans des conditions particulières, *Alfsen (1963)*, et *Ray, Reynolds, Polet et Steinhardt (1966)* notent des changements de conformation de l'albumine. *Attallah et Lata (1968)* trouvent un changement de conformation de l'albumine provoqué par la dilution, qui n'apparaît que si cette dilution est très importante.

Cependant, *Pearson, Keane et Walker (1967)* ne signalent pas cet effet de dilution avec l'albumine et *Baulieu et Raynaud (1969)* montrent que, pour trois dilutions du plasma, la liaison de la testostérone avec les protéines plasmatiques est en accord avec la loi des dilutions. Dans les cas habituels où les interactions sont en général mesurées, la dilution a un effet négligeable sur leur mesure et permet, au contraire, à l'expérimentateur de se placer dans les meilleures conditions expérimentales et de vérifier si l'interaction suit la loi d'action de masse.

I - INTERACTIONS AU NIVEAU PLASMATIQUE ()*

Les principaux stéroïdes hormonaux endogènes comme le cortisol (ou la corticostérone), la progestérone, la testostérone et l'oestradiol se fixent aux protéines plasmatiques, de façon non spécifique et de façon spécifique.

Leur liaison avec ces protéines est étudiée dans le plasma brut, ou sur des fractions de plasma partiellement purifiées ou encore sur les protéines pures.

1/ Système S

LIAISON A LA "CORTICOSTEROID BINDING GLOBULIN" (C.B.G.)

Généralités

Une protéine possédant une forte affinité pour le cortisol, mise en évidence dans le plasma humain, étudiée par *Sandberg et coll. (1957)*, *Upton et Bondy (1958)*, *Daughaday*

(*) Partiellement publié dans *Prog. Biochem. Pharmacol.*, **5**, 46. "The Use of Radioactive Steroids for the Study of Transport and Receptor Proteins. A New Graphical Methodology", E.E. Baulieu et J.P. Raynaud (1969) et dans *Annales d'Endocrinologie*, **30**, 183 "Mesure de la liaison de la corticostérone, du sulfate de corticostérone, de la testostérone et de l'oestradiol à des protéines du plasma", M.C. Lebeau, C. Mercier-Bodard, J. Olds, D. Bourquin, Th. Brécy, J.P. Raynaud et E.E. Baulieu (1969).

(1958a,b), *Slaunwhite et Sandberg* (1959), est appelée "Corticosteroid Binding Globulin" par *Daughaday* et "Transcortine" par *Sandberg*. *Sandberg, Rosenthal, Schneider et Slaunwhite* (1966), *Seal et Doe* (1966) et *Westphal* (1970), en font une revue générale et indiquent ses paramètres physico-chimiques. *Daughaday* (1958a), suggère que la CBG est une α_1 glycoprotéine et *Seal et Doe* (1962a) confirment ce résultat. *Slaunwhite et Sandberg* (1959) notent sa stabilité en fonction de la température et *Daughaday et coll.* (1962) inactivent la transcortine en chauffant le plasma à 60°C.

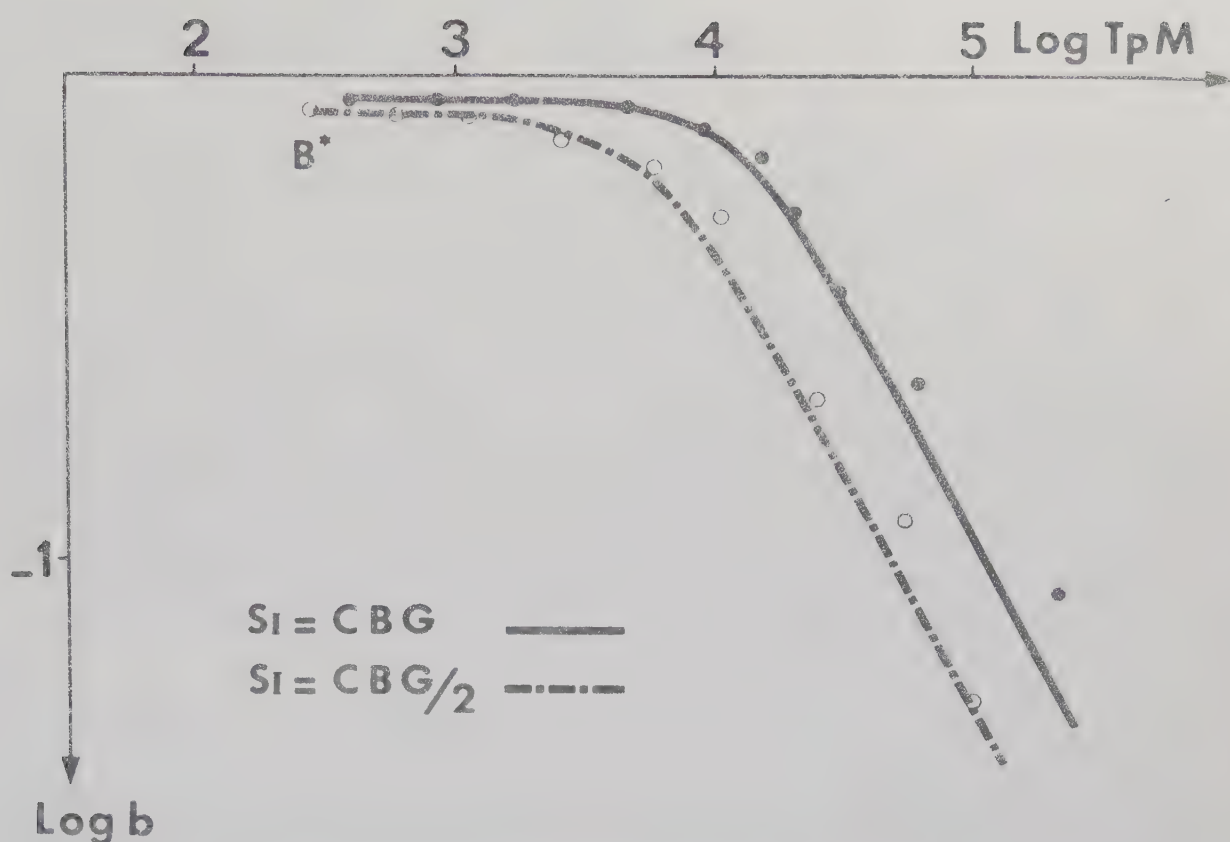
La purification de cette protéine est entreprise par *Seal et Doe* (1962a, b, 1963), qui trouvent pour la CBG, un seul site de liaison et un poids moléculaire de l'ordre de 50000. *Seal et Doe* (1966) donnent sa composition en acides aminés. *Slaunwhite, Schneider, Wissler et Sandberg* (1966), puis *Muldoon et Westphal* (1967), *Lebeau et Baulieu* (1970) purifient la CBG humaine, *Chader et Westphal* (1968a) la CBG du lapin et *Chader et Westphal* (1968b) celle du rat.

C'est avec la préparation de *Lebeau et Baulieu* que la liaison de la corticostérone, de la progestérone et du sulfate de corticostérone est étudiée à 4°C par la technique de dialyse précédemment décrite.

Liaison de la corticostérone

Pour la corticostérone, deux dilutions sont utilisées. La dilution 1 contient 0,1 mg de protéines par ml. Les courbes de liaison de la fraction liée pour les deux dilutions sont représentées sur la figure 4. Les écarts-types des paramètres sont indiqués dans le tableau.

Conformément à la théorie, la protéine est bien purifiée, puisque les points expérimentaux suivent la droite de pente -1 pour les fortes concentrations de ligand et répondent donc au modèle S. La dilution ne modifie pratiquement pas la constante intrinsèque d'association, et le nombre de sites est proportionnel à la dilution. Enfin, les valeurs de 0,8 et $1,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ sont du même ordre que la valeur de $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ trouvée par *Westphal* (1967).



	K_s $10^9 M^{-1}$	N_s $10^{-9} M$
DILUTION 1	0.8 ± 0.1	11.0 ± 1.0
DILUTION $1/2$	1.2 ± 0.1	4.8 ± 0.5

Fig. 4 - LIAISON DE LA CORTICOSTERONE A LA CBG

Les courbes de liaison pour 0,1 et 0,05 mg de protéines par ml sont représentées par la méthode du graphique proportionnel. Le logarithme de la fraction liée b est tracé en fonction du logarithme de la concentration totale du stéroïde T exprimée en pM. La fraction liée est mesurée par dialyse à l'équilibre à 4°C. La forme de la courbe correspond à un système S car aux concentrations les plus élevées cette courbe peut s'assimiler à une droite de pente -1. Les paramètres de la liaison (constante intrinsèque d'association K_S et concentration des sites de liaison N_S) sont indiqués dans le tableau. L'écart-type de ces paramètres a été évalué par ordinateur. Les résultats obtenus sont approximativement en accord avec la loi de dilution (Edsall et Wyman 1958) : K_S ne varie pas tandis que N_S est proportionnel à la dilution.

Liaison du sulfate de corticostérone

La liaison est mesurée, soit avec du sulfate de corticostérone radioactif, soit par compétition entre la corticostérone radioactive et le sulfate de corticostérone froid. La concentration de protéine est de 0,1 mg/ml. Les résultats sont indiqués sur la figure 5a. Le nombre de sites pour le sulfate de corticostérone est le même que pour la corticostérone tandis que la constante d'association est réduite de moitié. Le sulfate de corticostérone est compétiteur de la corticostérone pour le même site de fixation. Enfin, aux erreurs expérimentales près, on retrouve pour le sulfate de corticostérone la même constante d'association par compétition.

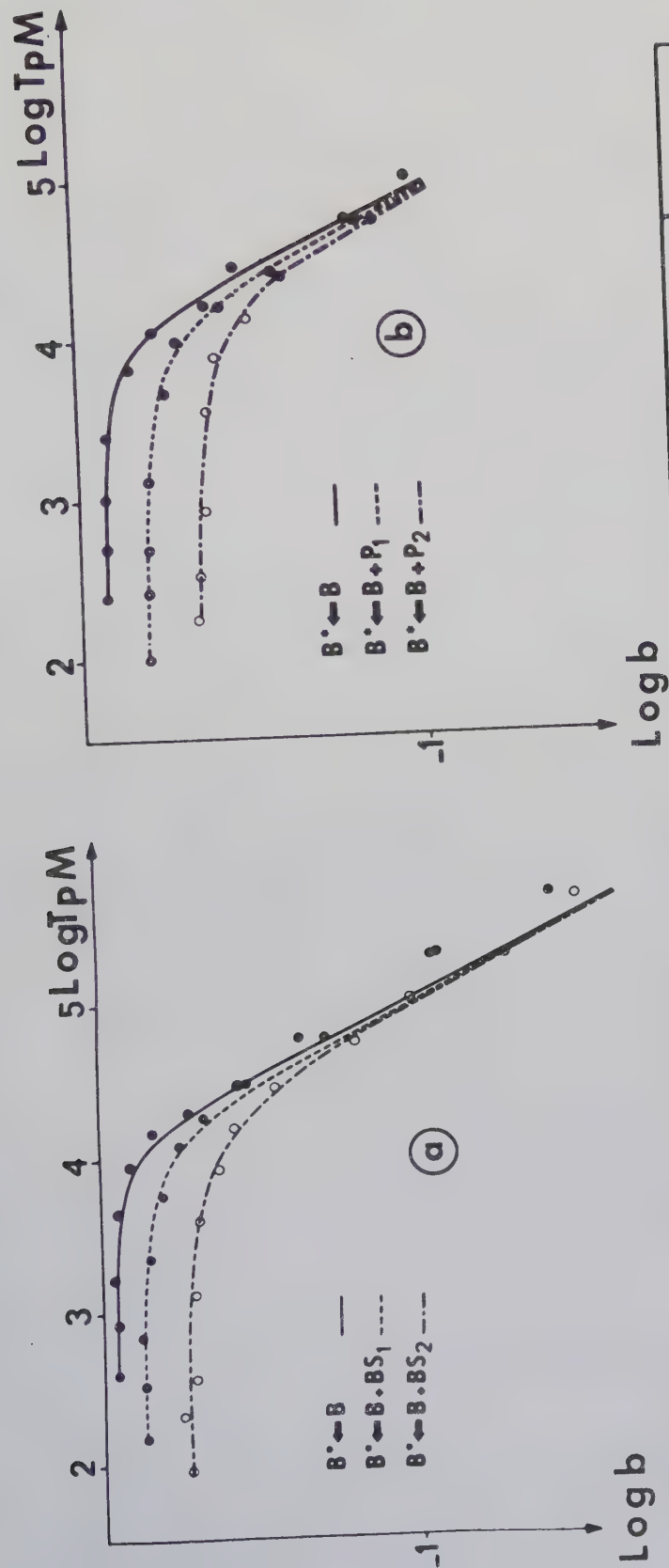
Liaison de la progestérone

La progestérone est également un bon compétiteur de la corticostérone, figure 5b. Les résultats par compétition sont identiques à ceux obtenus à partir de progestérone radioactive. La valeur de $0,4 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ pour la constante d'association est du même ordre que celle de $0,3 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ rapportée par *Seal et Doe (1966)*, mais plus faible que celle de $0,7 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ trouvée par *Westphal (1967)*. Cependant, il faut noter que la valeur de la constante d'association de $0,63 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ trouvée pour la corticostérone est faible pour cette préparation de CBG, sans doute légèrement altérée. Il se peut que, pour la même raison, la valeur de $0,4 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ pour la progestérone soit aussi un peu faible.

LIAISON A LA "SEX STEROIDS BINDING PLASMA PROTEIN"(S.B.P)

Généralités

Pour *Chen, Mills et Bartter (1961)*, la testostérone peut se lier dans la plasma à une protéine différente de l'albumine. *Mercier, Alfson et Baulieu (1966a)* séparent de l'albumine et de la transcortine, par chromatographie sur DEAE cellulose, une protéine liant la testostérone qu'ils appellent protéine de liaison de la testostérone PLT. *Mercier (1966b)* et *Mercier-Bodard et Baulieu (1968a)* déterminent sa spécificité, entre-



	K_s $10^9 M^{-1}$	K_c $10^9 M^{-1}$	N_s $10^{-9} M$
$B' \leftarrow B$	0.83 ± 0.07		11.0 ± 0.8
$B' \leftarrow B + BS_1$		0.34 ± 0.08	11 ± 1
$B' \leftarrow B + BS_2$		0.41 ± 0.09	11 ± 1
$BS \leftarrow BS$	0.40 ± 0.06		12 ± 1

	K_s $10^9 M^{-1}$	K_c $10^9 M^{-1}$	N_s $10^{-9} M$
$B' \leftarrow B$	0.63 ± 0.08		10.0 ± 0.8
$B' \leftarrow B + P_1$		0.48 ± 0.09	10.0 ± 0.5
$B' \leftarrow B + P_2$		0.35 ± 0.07	11 ± 1
$P' \leftarrow P$	0.40 ± 0.05		10.0 ± 0.8

Fig. 5 - LIAISON DU SULFATE DE CORTICOSTERONE ET DE LA PROGESTERONE A LA CBG ($0,1 \text{ mg/ml}$)

a - Sulfate de corticostérone

b - Progestérone

Deux différentes concentrations de compétiteur sont représentées (BS_1 , $P_1 = 5 \text{ } \mu\text{M}$ et BS_2 , $P_2 = 20 \text{ } \mu\text{M}$). Les constantes intrinsèques d'association indiquées dans le tableau correspondent à la corticostérone et au sulfate de corticostérone ou à la progestérone utilisés soit comme compétiteur à deux concentrations soit directement sous forme de ligand radioactif.

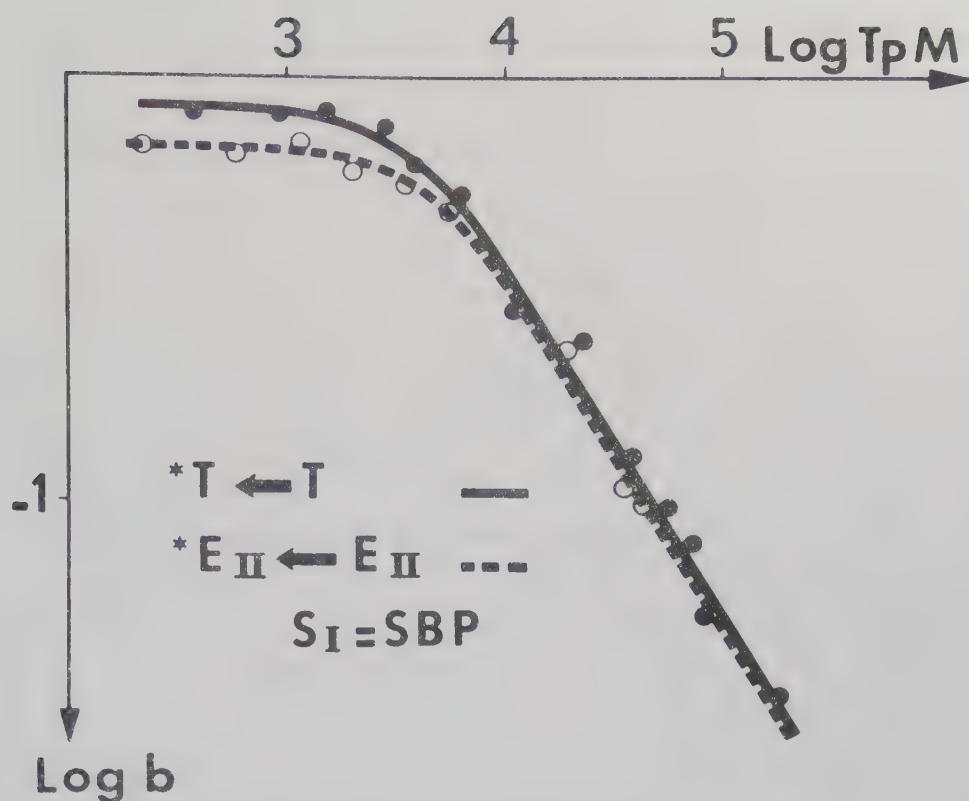
prennent de la purifier *Mercier et Baulieu (1968b)* et précisent la nature et les paramètres physicochimiques de la protéine pure *Mercier-Bodard, Alfzen et Baulieu (1970)*. *Burstein (1969)*, la sépare par colonne d'affinité. *Pearlman et Crepy (1966, 1967a)* montrent une liaison spécifique de la testostérone dans le plasma. *Guériguian et Pearlman (1968)*, séparent le TBC (Testosterone-Binding-Component) par chromatographie et confirment sa présence dans la fraction des globulines.

Rosenbaum, Christy et Kelly (1966) et *Tavernetti, Rosenbaum, Kelly, Christy et Roginsky (1967)* trouvent que l'oestradiol se lie à une fraction possédant en électrophorèse la mobilité d'une β globuline. En 1968, *Steen, Heyns, Van Baelen et De Moor, Van Baelen, Heyns, Schonne et De Moor* démontrent la liaison compétitive de l'oestradiol et de la testostérone. *Pearlman, Fong et Tou (1969)*, *Mercier-Bodard et Baulieu (1968a)* et *Lebeau et coll. (1969)*, confirment ce résultat. La spécificité hormonale de la liaison est déterminée dans le plasma par *Horton, Kato et Sherins (1967)*, *Kato et Horton (1968a)*, *Vermeulen et Verdonck (1968)*, *Mayes et Nugent (1968)* *Forest et coll. (1968)*, *Rosenfield, Eberlein et Bongiovanni (1969)*, *Heyns, Van Baelen et De Moor (1969a)*. *Mercier-Bodard et Baulieu (1968a)*, *Mercier-Bodard et coll. (1970)* l'étudient en utilisant la protéine purifiée.

Enfin, *Tavernetti et coll. (1967)*, *Pearlman, Crepy et Murphy (1967b)*, *Mercier, Alfzen et Baulieu (1967)*, *August, Tkachuk et Grumbach (1969)*, *Dray, Mowszowicz, Ledru, Crepy, Delzant et Sebaoum (1969a)*, *Dray (1969b)*, *Vermeulen, Verdonck, Van der Straeten et Orie (1969)*, *De Moor, Steeno, Heyns et Van Baelen (1969)*, déterminent dans différents états pathologiques, la liaison de la testostérone et de l'oestradiol à la SBP.

Liaison de la testostérone et de l'oestradiol

La SBP purifiée par *Mercier-Bodard et Baulieu (1968a)* à partir de la fraction IV de *Cohn*, est utilisée pour évaluer les paramètres de la liaison de la testostérone et de l'oestradiol à 4°C, figure 6. Les points expérimentaux suivent la droite de pente -1 pour les fortes concentrations de ligand, ce qui prouve que la préparation ne contient plus d'autres



	K_s ($10^9 M^{-1}$)	N_s ($10^{-9} M$)
Testosterone	1.2 ± 0.1	4.5 ± 0.5
Estradiol	0.46 ± 0.05	4.5 ± 0.5

Fig. 6 - LIAISON DE LA TESTOSTERONE ET DE L'OESTRADIOL A LA SBP

Les courbes de liaison montrent que cette préparation (0,5 mg de protéines/ml) ne contient pas de liaison non spécifique. Pour les deux hormones (T + EII), le nombre de sites N_s est identique. La position du plateau de l'oestradiol traduit une constante intrinsèque d'association plus faible que celle de la testostérone pour la SBP. Les résultats sont donnés dans le tableau.

protéines liantes. Le nombre de sites est identique pour les deux stéroïdes et des expériences complémentaires montrent que ces deux stéroïdes sont compétiteurs *Mercier-Bodard et Baulieu (1968a)*. La constante d'association de la testostérone pour la SBP est du même ordre que celle de la corticostérone pour la transcortine. Celle de l'oestradiol pour la SBP est environ 2,5 fois plus faible que celle de la testostérone. Ce résultat est en accord avec ceux publiés par *Kato et Horton (1968a)* et *Vermeulen et Verdonck (1968)* qui indiquent une affinité plus faible pour l'oestradiol.

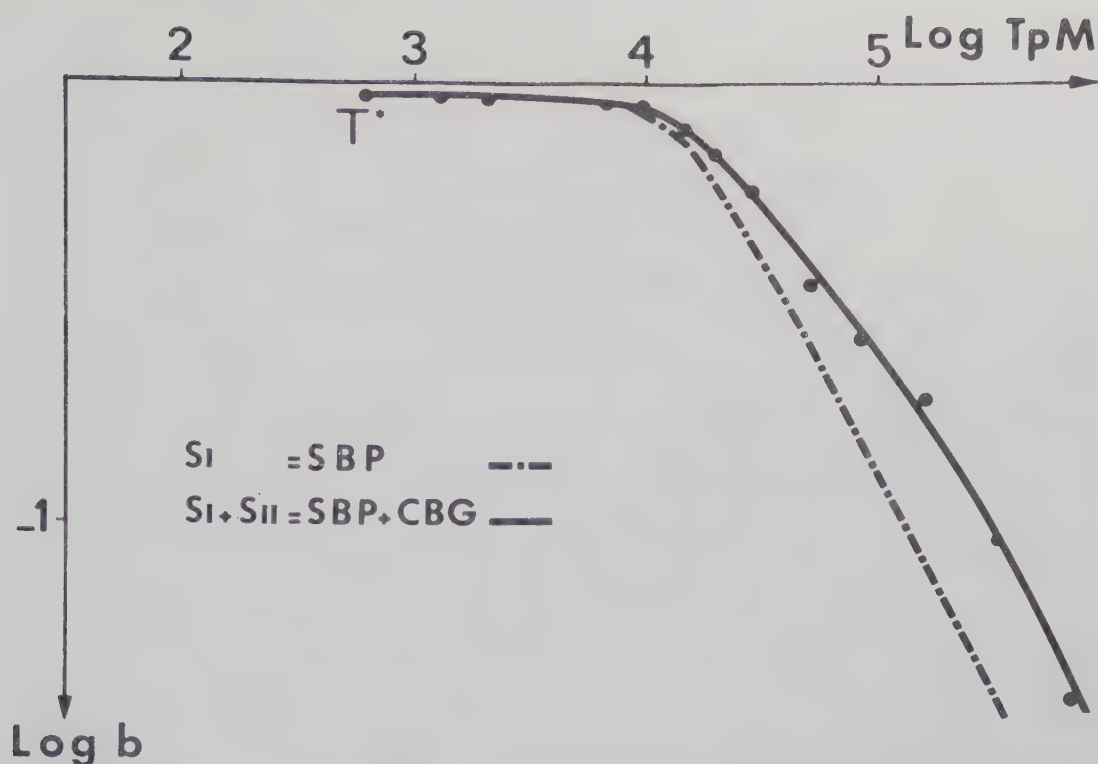
Après purification, les études sont faites à 4°C, pour des raisons de stabilité. Il est donc difficile de comparer la valeur obtenue pour la constante d'association de la testostérone avec les résultats de la littérature. En effet, les auteurs calculent la constante d'association à des températures plus élevées : 25 ou 37°C, à partir du plasma total. *Vermeulen et Verdonck (1968)* donnent une valeur assez imprécise de $0,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ à 37°C. Cependant, *Forest et coll. (1968)* montrent que cette constante augmente lorsque la température diminue. A partir de leurs résultats, lorsque la température passe de 37 à 4°C, la constante augmente d'environ 50 %, ce qui ramène la valeur de $0,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ que *Vermeulen* donne à 37°C à $1,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ pour 4°C. Cette valeur correspond à celle donnée dans le tableau de la figure 6.

2/ Système $S_I + S_{II}$

LIAISON A LA S.B.P ET A LA C.B.G

Liaison de la testostérone

Pour représenter la liaison de la testostérone à une des fractions protéiques purifiées à partir de la fraction IV de *Cohn* par *Mercier-Bodard*, il n'est pas possible d'utiliser le modèle S (figure 7). En effet, aux fortes concentrations, il y a divergence entre les points expérimentaux et la fonction calculée par l'ordinateur sur un modèle S. Par contre, avec un modèle $S_I + S_{II}$ tous les points expérimentaux corres-



	S B P		C B G	
	K_{sI} ($10^9 M^{-1}$)	N_{sI} ($10^{-9} M$)	K_{sII} ($10^9 M^{-1}$)	N_{sII} ($10^{-9} M$)
Dilution 1	1.4 ± 0.2	9.0 ± 2.0	0.03 ± 0.01	22 ± 5
Dilution 0.5	1.4 ± 0.2	4.5 ± 1.0	0.03 ± 0.01	10 ± 3

Fig. 7 - LIAISON DE LA TESTOSTERONE A LA SBP ET A LA CBG

La courbe indique la présence d'un système $S_I + S_{II}$. En effet, la courbe pointillée représente la meilleure solution par ordinateur si un modèle S est utilisé. Il y a ainsi divergence entre la courbe et les points expérimentaux. La mise en évidence de la liaison spécifique S_{II} n'est possible que par l'emploi du graphique proportionnel. Celui-ci contrairement aux autres méthodes graphiques, permet de visualiser la courbe de liaison pour de grandes variations de concentrations. Afin de simplifier le graphique, la courbe correspondant à la dilution 0,5 n'est pas représentée. La concentration en protéines est respectivement 0,3 et 0,15 mg/ml. Le tableau des résultats indique les valeurs des paramètres de la liaison mesurée par dialyse à l'équilibre à 4°C qui suivent parfaitement la loi de dilution.

pondent à la courbe théorique comme l'indique pour la dilution 1 (0,30 mg de protéine/ml) le graphique de la figure 7. Pour les deux dilutions utilisées, les constantes d'association K_{S_I} et $K_{S_{II}}$ ne changent pas, tandis que les concentrations de sites varient dans le même rapport que les dilutions, comme le veut le critère de *Edsall et Wyman (1958)*. La constante intrinsèque d'association K_{S_I} est identique, dans la limite des erreurs expérimentales, à celle trouvée dans le cas précédent pour le complexe SBP-testostérone. La seconde constante d'association $K_{S_{II}}$, a une valeur beaucoup plus faible. K_{S_I} peut donc être attribué à la SBP, tandis que la protéine à laquelle correspond la constante $K_{S_{II}}$ est vraisemblablement la CBG. En effet, la préparation protéique lie aussi la corticostérone et cette valeur de $K_{S_{II}}$ est compatible avec celle de la constante d'association testostérone-CBG à 4°C. *Doe et Seal (1963)* donnent une valeur de $1,4 \times 10^6 M^{-1}$ à 37° pour la constante testostérone-CBG. On sait que l'affinité des stéroïdes pour la CBG augmente de 10 à 30 fois lorsque la température diminue de 37 à 4°C *Westphal (1967)*. Cette valeur de $1,4 \times 10^6 M^{-1}$ devient de l'ordre de $0,03 \pm 0,01 \times 10^9 M^{-1}$ à 4°C.

3/ Système S + NS

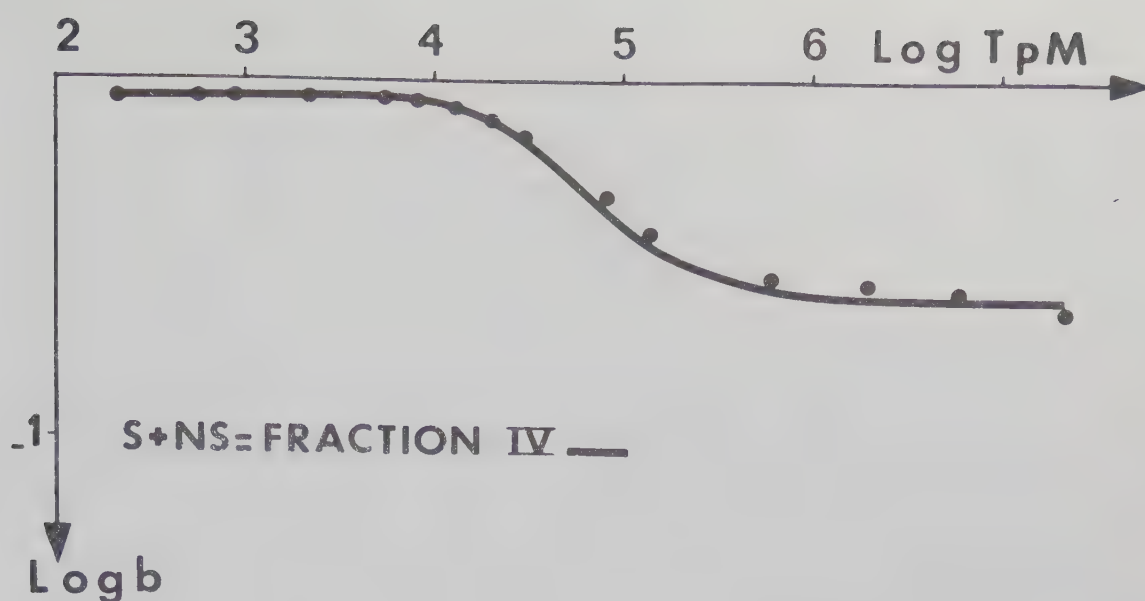
LIAISON A LA FRACTION IV

Généralités

L'existence dans le plasma humain d'une protéine liant fortement le cortisol et la corticostérone CBG est établie, pour la première fois par *Sandberg et coll. (1957)*, à partir de la fraction IV de *Cohn*, contenant peu d'albumine, mais liant le cortisol et la corticostérone plus fortement que les autres fractions.

Liaison de la corticostérone

Une liaison non spécifique s'ajoute à la liaison spécifique (figure 8). Le modèle S + NS, permet de déterminer



K_s $10^9 M^{-1}$	N_s $10^{-9} M$	$K_{ns} \quad N_{ns}$
0.55 ± 0.08	23 ± 3	0.30 ± 0.15

Fig. 8 - LIAISON DE LA CORTICOSTERONE A LA FRACTION IV DE COHN

La fraction IV de Cohn a été fournie par le Centre de Transfusion Sanguine de Paris. La forme en S de la courbe de liaison est caractéristique d'un système S + NS. En effet, cette fraction contient la CBG mais également un peu d'albumine qui lie non spécifiquement la corticostérone. En pratique cette forme de courbe est observée dans la majorité des cas où la liaison est étudiée dans des préparations protéiques non purifiées comme par exemple la liaison des corticostéroïdes dans le plasma de différentes espèces, la liaison des oestrogènes dans le cytosol, etc... à la seule condition qu'il existe conjointement une liaison spécifique. La fraction liée a été mesurée par dialyse à l'équilibre à 4°C. Les paramètres de cette liaison sont indiqués dans le tableau.

les paramètres de liaison du complexe corticostérone-CBG dans cette fraction brute. La constante d'affinité pour la CBG obtenue dans ce système est du même ordre que celle obtenue dans le système S (CBG purifiée). Ceci prouve que la protéine n'est pas altérée au cours de sa purification.

4/ Système $S_I + S_{II} + NS$

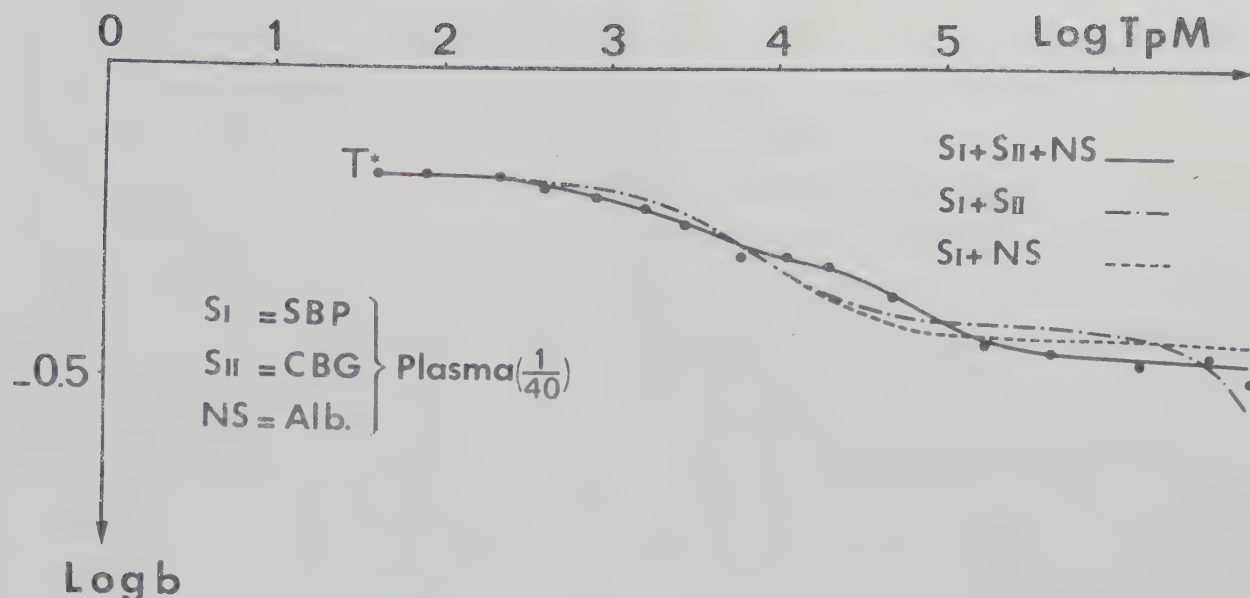
LIAISON AU PLASMA HUMAIN

Liaison de la testostérone

La testostérone se liant dans le plasma avec l'albumine, la SBP et la CBG, il est nécessaire d'appliquer le système $S_I + S_{II} + NS$. Les stéroïdes endogènes éventuellement présents dans le plasma sont préalablement enlevés en dialysant le plasma pendant trois jours contre une solution externe renouvelée en permanence.

La figure 9 représente, à 4°C, la liaison de la testostérone au plasma humain dilué au 1/40. D'après les points expérimentaux, les courbes obtenues par ordinateur et la variance résiduelle, cette liaison ne peut être correctement représentée, ni par le modèle $S + NS$, ni par le modèle $S_I + S_{II}$. Par contre, pour le modèle $S_I + S_{II} + NS$, les points expérimentaux se placent sur la courbe calculée d'après le modèle.

La constante d'association de la testostérone pour la SBP (K_{S_I}) est du même ordre, quoique légèrement supérieure, que celle trouvée pour la protéine purifiée ou partiellement purifiée. Les valeurs inférieures obtenues dans les deux cas précédents sont peut-être dues à une légère altération, soit au cours du fractionnement alcoolique, soit au cours de la purification. La deuxième constante $K_{S_{II}}$ correspond probablement au complexe testostérone-CBG. En effet, cette valeur est identique à celle obtenue dans le système $S_I + S_{II}$ de la préparation débarassée d'albumine et de plus la concentration de sites recalculée pour du plasma non dilué est de $5,6 \times 10^{-7} M$, chiffre comparable à celui d'environ $7 \times 10^{-7} M$ publié par Doe et Seal (1963) et Westphal (1967) pour la CBG.



Model	K_{SI} ($10^9 M^{-1}$)	N_{SI} ($10^{-9} M$)	K_{SII} ($10^9 M^{-1}$)	N_{SII} ($10^{-9} M$)	$K_{NS} N_{NS}$	variance
S + ns	0.71 ± 0.14	2.1 ± 0.4			0.59 ± 0.03	0.010
$S_I + S_{II}$	0.88 ± 0.15	1.7 ± 0.3	0.0001 ± 0.00005	6700 ± 3300		0.009
$S_I + S_{II} + ns$	1.9 ± 0.5	0.6 ± 0.2	0.033 ± 0.018	14 ± 6	0.50 ± 0.03	0.003

Fig. 9 - LIAISON DE LA TESTOSTERONE DANS LE PLASMA HUMAIN

Le plasma a été dilué au 1/40 et la liaison mesurée par dialyse à l'équilibre à 4°C. Les points expérimentaux ne correspondent à la courbe obtenue par ordinateur que si le modèle $S_I + S_{II} + NS$ est utilisé. En effet, dans les deux autres modèles les courbes obtenues par ordinateur s'écartent des points théoriques. Cette observation graphique est vérifiée par le calcul de la précision de l'ajustement indiquée dans la colonne "variance" du tableau. Comme la testostérone se lie spécifiquement dans le plasma à la SBP, à la CBG et non spécifiquement à l'albumine il est logique d'être en présence d'un système $S_I + S_{II} + NS$, si le rapport des paramètres permet de mettre un tel système en évidence. Le tableau indique pour chaque modèle les valeurs des paramètres obtenues par ordinateur. Ces paramètres sont significativement différents d'un modèle à l'autre ce qui démontre l'importance du choix d'un bon modèle. Ainsi on remarquera que c'est seulement le modèle $S_I + S_{II} + NS$ qui donne des valeurs de K_{SI} et K_{SII} identiques à celles trouvées avec la SBP purifiée (fig. 6) ou le mélange SBP + CBG (fig. 7). Ce plasma a été également dilué au 1/20 et 1/10 (Baulieu et Raynaud 1969). Les valeurs obtenues suivaient malheureusement la loi de dilution quelque soit le modèle utilisé mettant ainsi en évidence la nécessité de sélectionner le bon modèle et par conséquent l'importance d'une bonne représentation graphique.

En utilisant un mauvais modèle, on obtient des valeurs précises, mais fausses, pour les constantes d'association. Les valeurs données par *Forest et coll. (1968)*, *Vermeulen et Verdonck (1968)* et *Pearlman (1970)* doivent donc être acceptées avec réserve. Les expériences de *Vermeulen et Verdonck* et de *Pearlman* sont faites à 25°C et dans ce cas la constante d'association de la testostérone pour la CBG est plus diminuée par l'augmentation de température que celle de la testostérone pour la SBP ; il devient alors difficile de mettre en évidence le système S_{II} qui joue un rôle moins important, sauf dans le cas de plasma de femme enceinte où la concentration de CBG est élevée.

Enfin, la décomposition de la courbe de liaison totale en ses trois composantes, figure 10, permet de connaître, pour une concentration donnée de testostérone, quelle est sa répartition sur les trois protéines plasmatiques liantes. Le premier graphique correspond à du plasma dilué au 1/40. Comme pour trois dilutions de ce plasma, le rapport de la concentration des sites de liaison est identique au rapport de dilution, *Baulieu et Raynaud (1969)*, il est possible de déduire les courbes de liaison du plasma non dilué à 4°C. La liaison de la testostérone sur les différentes protéines est différente et plus faible à 37°C car les constantes d'association sont fonction de la température. La fraction libre est plus importante, cependant le nombre de sites pour chaque protéine reste identique.

L'indication sur le graphique de la concentration de testostérone plasmatique chez la femme, l'homme et dans des cas pathologiques montre que la SBP joue un grand rôle physiologique dans le contrôle de la fraction libre de testostérone. En effet, la concentration plasmatique de testostérone chez la femme est loin de pouvoir saturer les sites de liaison de la SBP tandis que chez l'homme elle correspond au début de la saturation et que dans les cas pathologiques, ces sites sont complètement saturés. Dans ce dernier cas, la régulation de la fraction libre se fait par la transcortine et l'albumine.

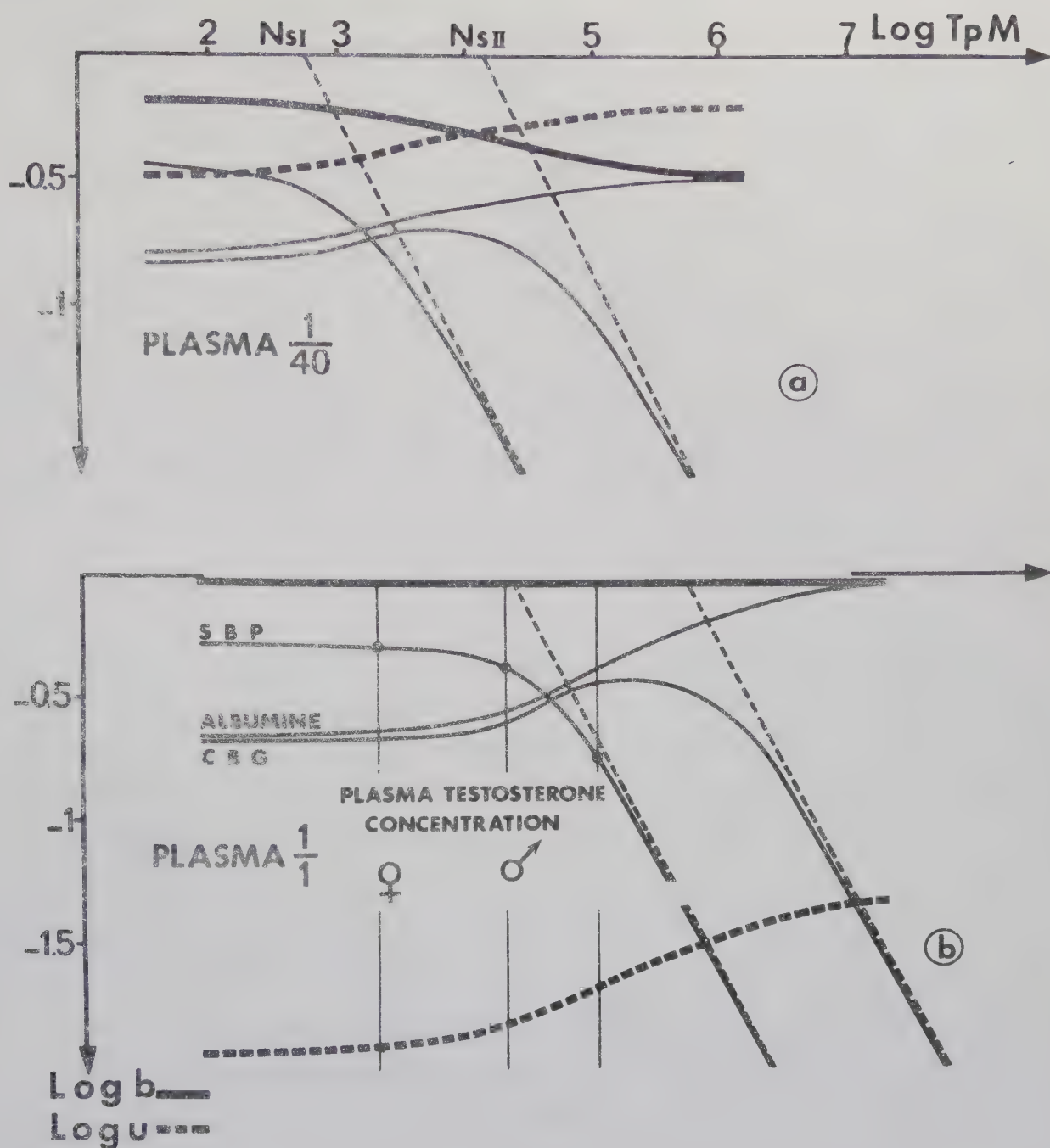


Fig. 10 - LIAISON DE LA TESTOSTERONE AU PLASMA HUMAIN

a - Décomposition de la courbe de liaison au 1/40 en ses trois composantes.

b - Liaison de la testostérone sur les différentes protéines du plasma non dilué.

Les courbes ont été calculées à partir de la dilution 1/40. La concentration de la testostérone plasmatique est indiquée chez la femme, chez l'homme et dans les cas pathologiques. La concentration de testostérone chez l'homme correspond au début de saturation de la SBP. Dans les cas pathologiques la fraction de testostérone libre indiquée par l'intersection de la courbe en pointillée avec la troisième ligne verticale est plus élevée.

II - INTERACTIONS AU NIVEAU TISSULAIRE (*)

La recherche et l'identification de récepteurs dans des organes cibles font l'objet de nombreuses études.

La fixation des oestrogènes dans l'utérus étant particulièrement étudiée, les interactions de l'oestradiol avec les protéines solubles d'origine cytoplasmique (protéines cytosolubles) ou d'origine nucléaire sont analysées dans différentes espèces. Ceci afin, d'une part, de montrer les possibilités d'applications des techniques décrites et d'autre part, de donner des valeurs précises pour les paramètres de ces interactions.

LIAISON DE L'OESTRADIOL AUX PROTEINES CYTOSOLUBLES

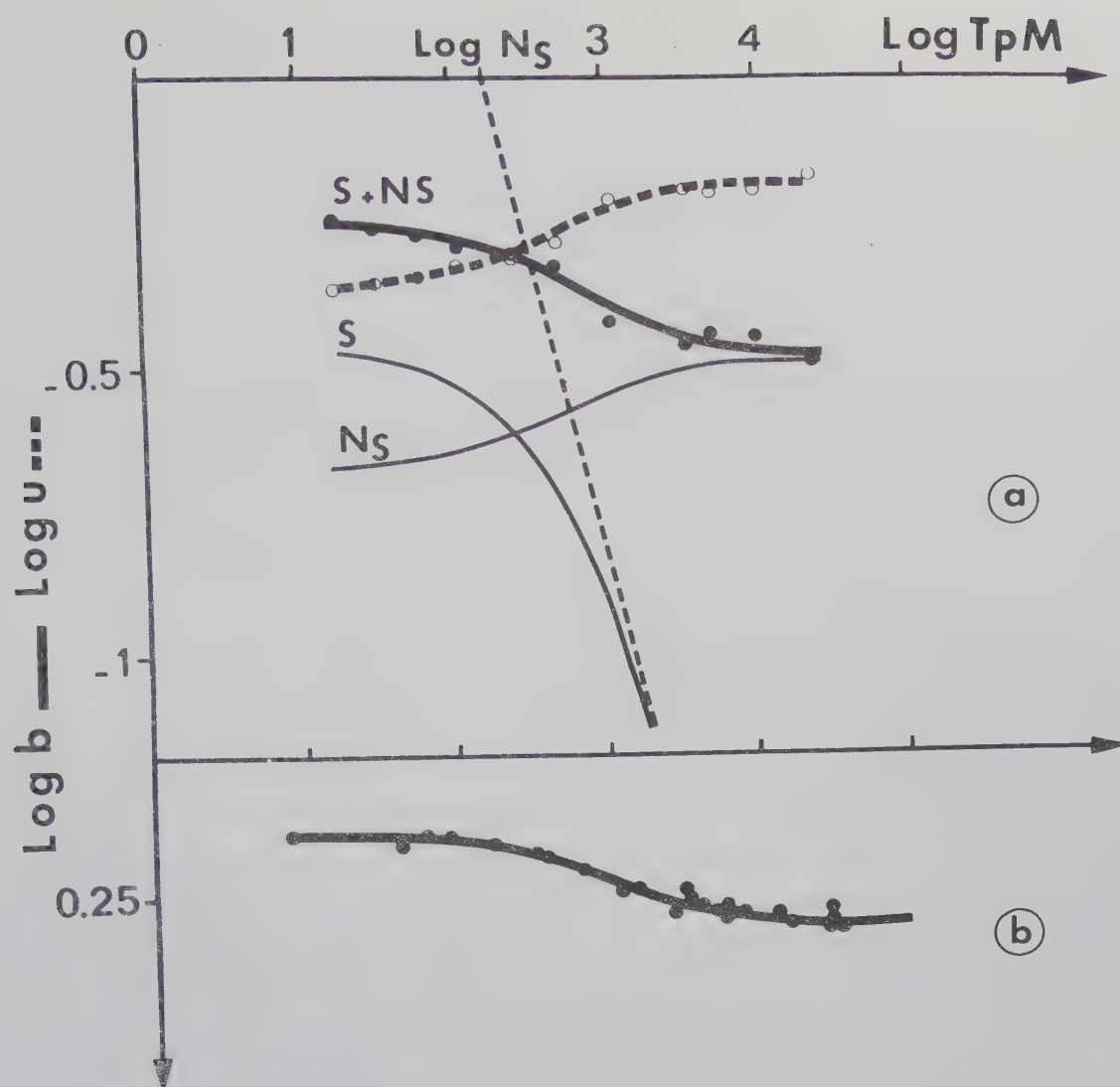
La liaison de l'oestradiol aux protéines cytosolubles est étudiée dans l'endomètre de Truie, dans l'endomètre de Veau et dans l'utérus de Rat. L'endomètre ou l'utérus total sont homogénéisés et les protéines se retrouvent dans le surnageant de ce broyat après une heure de centrifugation à 105.000 g (cytosol).

Endomètre de Truie

Les protéines sont préparées à partir d'endomètre de Truies impubères et leur liaison mesurée par dialyse à l'équilibre à 4°C. La spécificité hormonale et tissulaire de cette interaction, la nature protéique et un début de purification sont rapportés par *Baulieu, Alberga et Jung (1967a,b)*.

Comme le montre la figure 11, cette liaison peut se représenter par un système S + NS. Pour les deux dilutions

(*) Partiellement publié par E.E. Baulieu et J.P. Raynaud (1969) dans *Prog. Biochem. Pharmacol.*, 5, 46. "The Use of Radioactive Steroids for the Study of Transport and Receptor Proteins. A New Graphical Methodology", et par A. Alberga, N. Massol, J.P. Raynaud et E.E. Baulieu (1971). *Estradiol Binding of Exceptionally High Affinity by a Non Histone Chromatin Protein Fraction.* (en préparation)



	K_s $10^9 M^{-1}$	N_s $10^{-12} M$	$K_{ns} \quad N_{ns}$
S-2mg	4.9 ± 0.2	163 ± 34	0.49 ± 0.04
S-4mg	5.3 ± 0.2	291 ± 31	0.99 ± 0.03
chauffé S-4mg			1.25 ± 0.05

Fig. 11 - LIAISON DE L'OESTRADIOL AUX PROTEINES CYTOSOLUBLES
ENDOMETRE DE TRUIE

a - Cytosol contenant 2 mg de protéines/ml.

Décomposition de la courbe de liaison représentative d'un système S + NS en ses deux composantes.

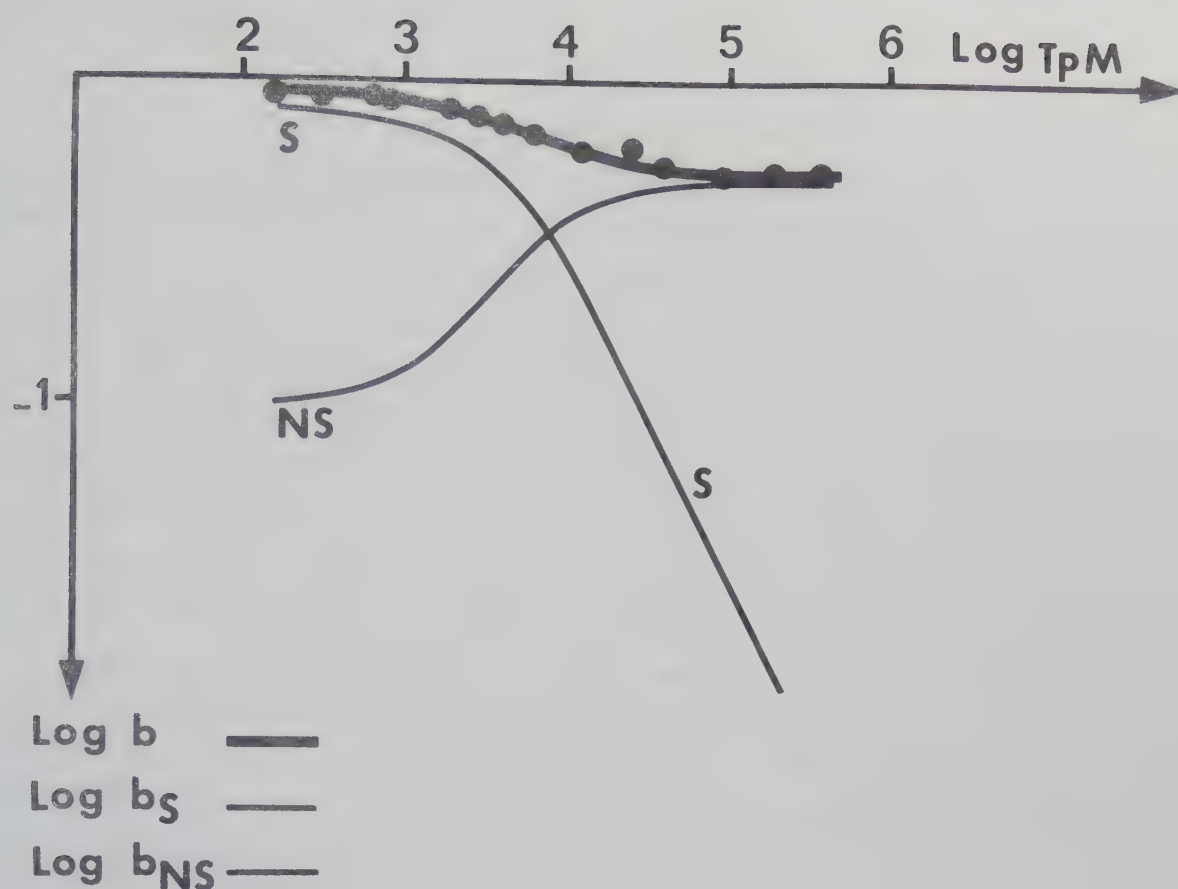
b - Cytosol contenant 4 mg de protéines/ml.

Le tableau des résultats montre que la loi des dilutions est respectée. Le chauffage de ce cytosol fait disparaître la liaison spécifique et augmente la liaison non spécifique.

(2 et 4 mg de protéines par ml) utilisées, la constante intrinsèque d'association ($5 \times 10^9 \text{M}^{-1}$) n'est pas modifiée, le nombre de sites est proportionnel à la dilution, ce qui confirme la validité du modèle. Si l'on chauffe à 60° pendant une heure ce surnageant, le récepteur est dénaturé et la liaison spécifique disparaît. On note incidemment que la liaison non spécifique est augmentée de 25 % par ce chauffage. Ce phénomène se produit également lorsqu'on chauffe de l'albumine, ce qui rend critiquable la technique de dialyse double avec du plasma chauffé, de Daughaday et coll. (1962).

Utérus de Rate impubère

Le surnageant (3 mg de protéines par ml) est préparé à partir d'utérus total de rates impubères (21 jours) et la liaison est déterminée à 4°C par dialyse à l'équilibre. Le système S + NS s'adapte aux résultats expérimentaux (figure 12). La décomposition de la courbe en ses deux composantes indique que la contribution des protéines non spécifiques à la liaison est moins importante aux faibles concentrations que dans le cas précédent. Le nombre de sites est supérieur. Cette augmentation de sites peut être due à une concentration d'oestradiol endogène inférieure chez le rat, ou encore à une différence de concentration des sites de fixation entre l'endomètre et l'utérus total en général. Pour limiter la participation de l'oestradiol endogène, des animaux impubères sont utilisés, mais le contrôle est plus facile chez la rate que chez la truie. L'idéal est d'éliminer les stéroïdes endogènes du surnageant, mais ce traitement préalable peut entraîner une dénaturation de ces protéines très instables. La constante intrinsèque d'association ($3 \times 10^9 \text{M}^{-1}$) est du même ordre que pour l'endomètre de Truie. Elle correspond à celles publiées pour la Rate par Gorski, Toft, Shyamala, Smith et Notides (1968), Erdos (1968a) et Toft, Shyamala et Gorski (1967) ; ces derniers indiquent une valeur de $1,4 \times 10^9 \text{M}^{-1}$; la technique qu'ils utilisent est cependant moins précise. L'instabilité de ces protéines ne permet pas une mesure aussi reproductible que pour les protéines plasmatiques.



K_S $10^9 M^{-1}$	N_S $10^{-9} M$	$K_{NS} \quad N_{NS}$
3.2 ± 0.4	2.7 ± 0.4	0.98 ± 0.16

Fig. 12 - LIAISON DE L'OESTRADIOL AUX PROTEINES CYTOSOLUBLES
UTERUS DE RATE IMPUBERE

Comme dans le cas précédent le cytosol 105000 g d'utérus contenant 3 mg de protéines/ml est incubé 1 heure avec de l'oestradiol radioactif. La liaison à ces protéines tissulaires est évaluée par dialyse à l'équilibre à 4°C. La courbe de liaison correspond à un système S + NS et est décomposée en ses deux parties (liaison spécifique et liaison non spécifique). La valeur et l'écart-type des paramètres sont indiqués dans le tableau.

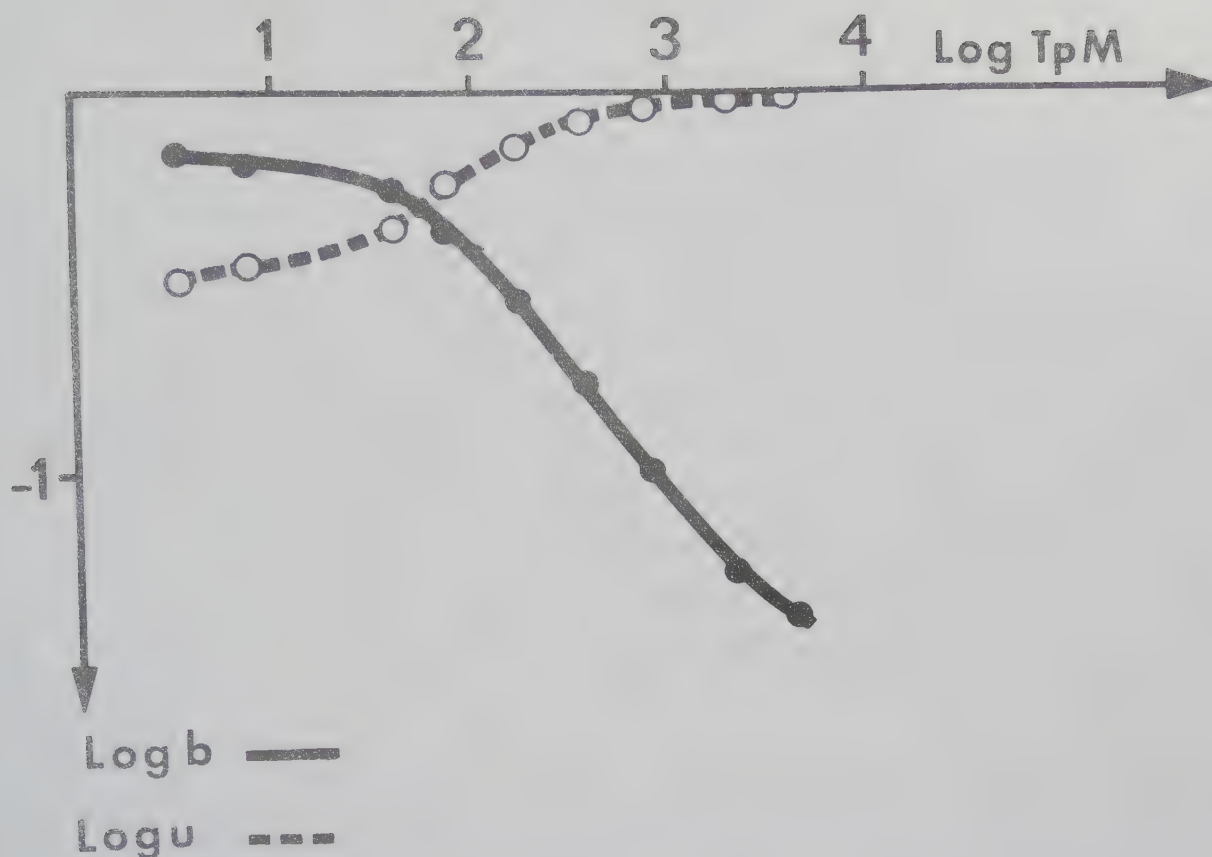
Endomètre de Génisse

La préparation du surnageant se fait de façon identique à celle du cas précédent. La mesure à 4°C est faite par la méthode du charbon enrobé de dextran et non par dialyse à l'équilibre, car cette étude est comparée à celle effectuée sur les noyaux d'endomètre de génisse pour laquelle, seule la méthode du charbon est applicable.

Comme l'indique la représentation graphique et le tableau de la figure 13, les résultats diffèrent de ceux des cas précédents. Tout d'abord, la liaison non spécifique pour une concentration protéique de 1 mg/ml est très faible, pour la simple raison que la faible constante d'association de cette liaison entraîne une dissociation pratiquement complète du complexe non spécifique en présence de charbon. La valeur de la concentration de stéroïde libre est surestimée tandis que la constante d'association pour le récepteur spécifique est sous-estimée.

La concentration des sites spécifiques de liaison est beaucoup plus faible que dans le cas précédent ; on sait que la méthode au charbon peut dissocier les complexes spécifiques.

La valeur de la constante intrinsèque d'association est dix fois plus grande que dans les deux cas précédents. La différence d'espèce peut expliquer une telle divergence ; toutefois, il faut rappeler que cette technique est très rapide, alors que la protéine peut être légèrement altérée au cours de la dialyse qui dure beaucoup plus longtemps. *Puca et Bresciani* (1969) donnent, pour l'utérus entier, une valeur plus faible ($1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) mais ils utilisent la filtration sur gel au cours de laquelle le complexe spécifique se dissocie et leur valeur est vraisemblablement inférieure à la valeur réelle.



Ks $10^9 M^{-1}$	Ns $10^{-12} M$	Kns Nns
44 ± 3	49 ± 3	0.036 ± 0.019

Fig. 13 - LIAISON DE L'OESTRADIOL AUX PROTEINES CYTOSOLUBLES
ENDOMETRE DE GENISSE

Le cytosol contient 1 mg de protéines/ml. La courbe de liaison peut presque s'assimiler à une courbe représentative d'un système S. La liaison non spécifique est très faible car, elle a été mesurée à 4°C par la technique du charbon, technique dans laquelle la liaison non spécifique est pratiquement éliminée par dissociation du complexe non spécifique.

LIAISON DE L'OESTRADIOL A UNE PROTEINE NUCLEAIRE

Il existe dans le noyau un récepteur dont la formation semble dépendre de la présence simultanée du récepteur cytoplasmique et de l'hormone *Shyamala et Gorski (1969)*, *Jensen, Suzuki, Kawashima, Stumpf, Jungblut et Desombre (1968)*, *Rocheffort et Baulieu (1968)*. Un autre récepteur nucléaire de l'oestradiol, à la formation duquel, la présence de l'oestradiol n'est pas indispensable, est mis en évidence dans un extrait nucléaire d'endomètre de Génisse correspondant à la "fraction des protéines acides" de la chromatine *Alberga (1970)*, *Alberga, Massol, Raynaud et Baulieu (en préparation)*. Ce récepteur dont la concentration est très faible et l'affinité très élevée, n'est mis en évidence que par des concentrations d'oestradiol 1000 fois plus faibles (de l'ordre du pM) que celles généralement utilisées.

Trois préparations différentes de protéines sont utilisées pour la détermination des constantes de ce récepteur. La méthode de préparation est décrite dans la référence précédente et n'est pas redétaillée ici, l'objet de ce chapitre étant uniquement l'application de la technique de mesure. La dialyse à l'équilibre ne peut être utilisée pour cette étude, car la liaison non spécifique est trop importante par rapport à la liaison spécifique. C'est donc par la technique du charbon enrobé de dextran que les fractions libre et liée sont mesurées à 4°C.

Préparation n° 1

La première expérience est faite avec une préparation contenant 1,3 mg de protéines par ml et avec des concentrations d'oestradiol variant de 1 à 500 pM. Aux deux concentrations d'oestradiol les plus faibles, la liaison est de 100 %, ce qui indique que, si elle suit la loi d'action de masse, la constante d'association doit être très élevée. Dans l'analyse mathématique, il n'est pas tenu compte de ces deux points. Pour cette raison, la courbe obtenue figure 14a donne, comme meilleure approximation, des valeurs sous-estimées d'une constante d'affinité de $4 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ et d'un nombre de sites de 3,43 pM.

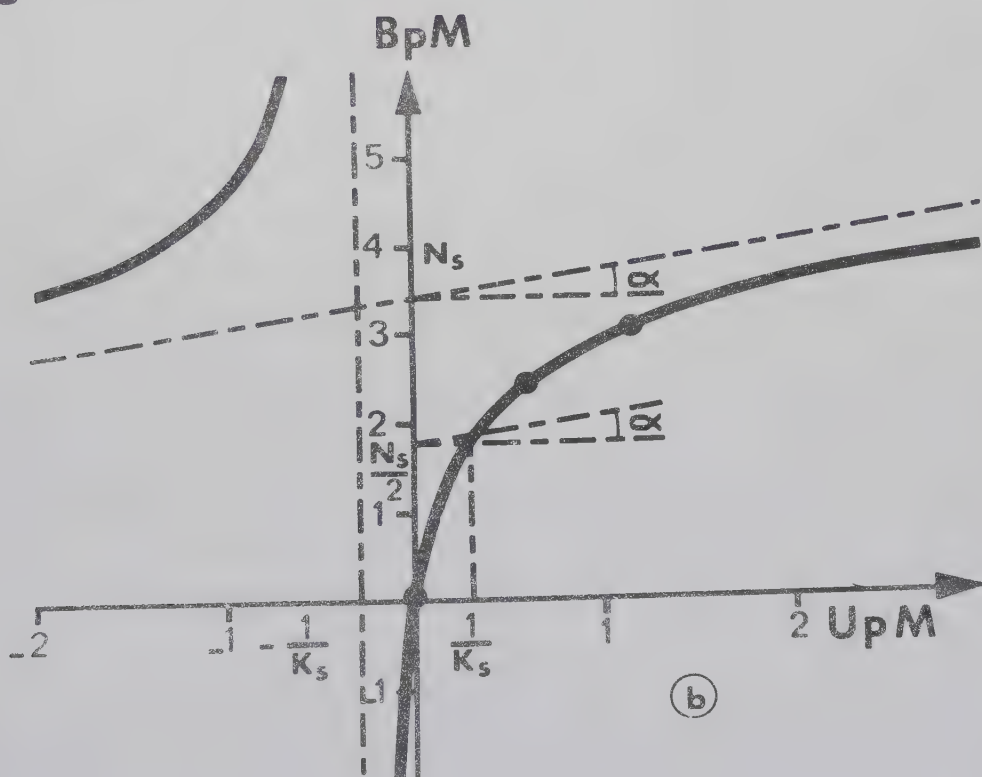
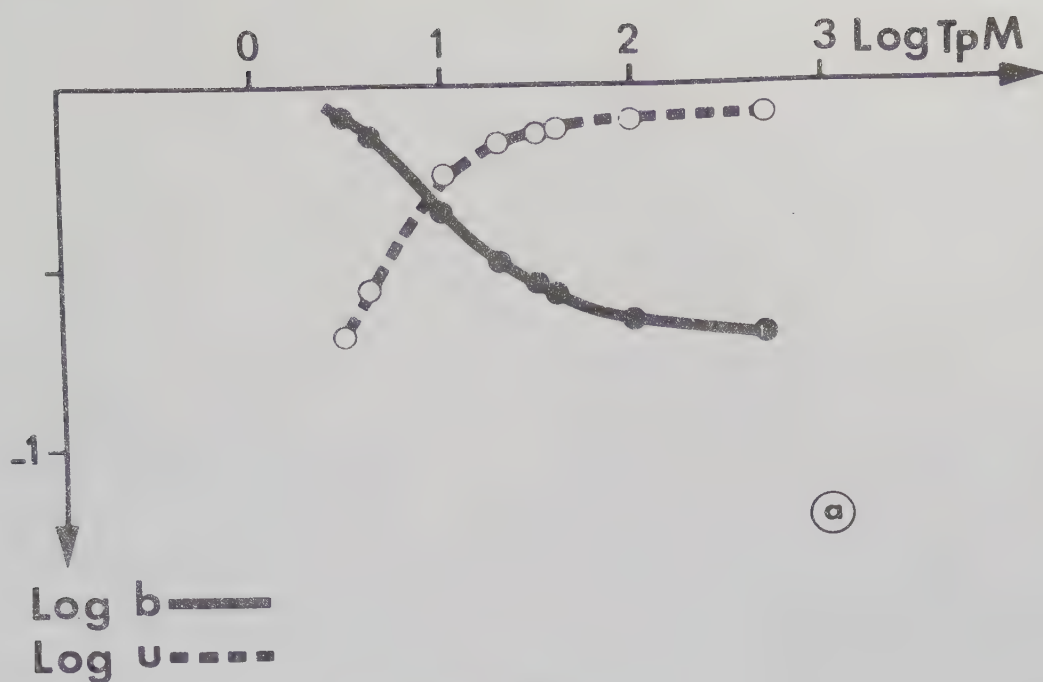


Fig. 14 - LIAISON DE L'OESTRADIOL A UNE PROTEINE NUCLEAIRE

a - Graphique proportionnel pour la préparation n° 1.

La liaison est mesurée à 4°C par la technique du charbon.

b - Représentation graphique de B vs U .

L'asymptote oblique caractéristique de la présence d'une liaison non spécifique permet de la calculer tandis que l'asymptote verticale permet d'estimer la constante intrinsèque d'association. Le nombre de sites N_s est déterminé par l'intersection entre l'asymptote oblique et l'axe des ordonnées.

Préparation n° 2

Pour cette préparation dont la concentration en protéines est identique à la précédente, la constante d'association est négative (figure 15a et tableau figure 16). Bien que ces résultats n'aient aucune signification biochimique, ils peuvent être interprétés mathématiquement. Si l'on se réfère aux figures 14b et 15b, une valeur négative de K signifie que l'asymptote verticale de la fonction se trouve dans la région positive de U . De plus, puisque la fonction doit passer par l'origine, les points expérimentaux sont situés au-dessus de l'asymptote oblique. En effet, les points déterminés aux concentrations d'oestradiol les plus faibles de la zone étudiée sont entachés d'une erreur expérimentale telle que la fonction (figure 15b) peut suivre une branche de l'hyperbole différente de la figure 14b, ayant une asymptote verticale dans la région positive de U . Cette simple erreur expérimentale ne peut changer complètement l'allure de la fonction que si la plus faible concentration d'oestradiol à laquelle une mesure de la liaison est faite, est déjà près de l'asymptote, donc dans la zone de saturation. La valeur de la constante d'association est déduite de la valeur de la concentration qui donne 50 % de la liaison (figure 14b). Donc, $1/K$ est inférieur à la plus petite concentration de U , ce qui donne une valeur de $K > 20 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$.

Préparation n° 3

Les paramètres de cette interaction, n'étant pas déterminés par les deux expériences précédentes, une troisième expérience a été faite, dans laquelle la concentration de protéines a été réduite (0,5 mg/ml). Toute la difficulté réside en fait, dans la mesure de très faibles concentrations d'oestradiol, car le domaine de concentration où se trouve $1/K$ est de l'ordre de 10 fM. Comme l'activité spécifique la plus forte, actuellement disponible sur l'oestradiol, est de 100 C/mM, les résultats sont obligatoirement déduits de l'extrapolation des courbes obtenues pour des concentrations de ligand beaucoup plus fortes, figure 16. Pour que cette extrapolation ait

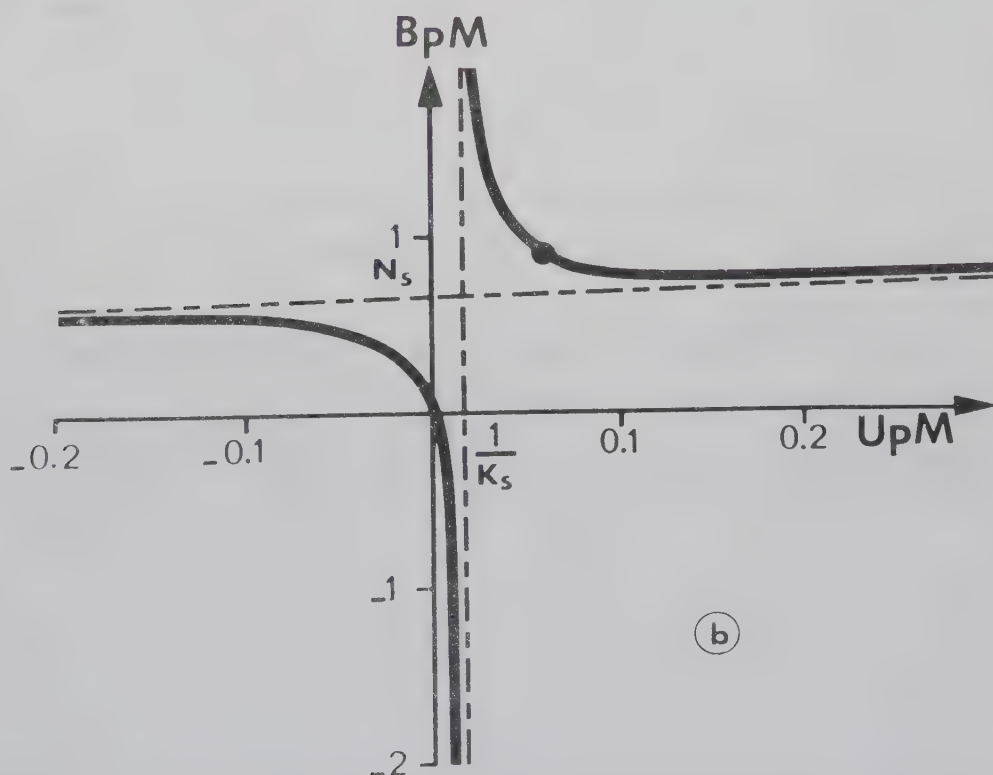
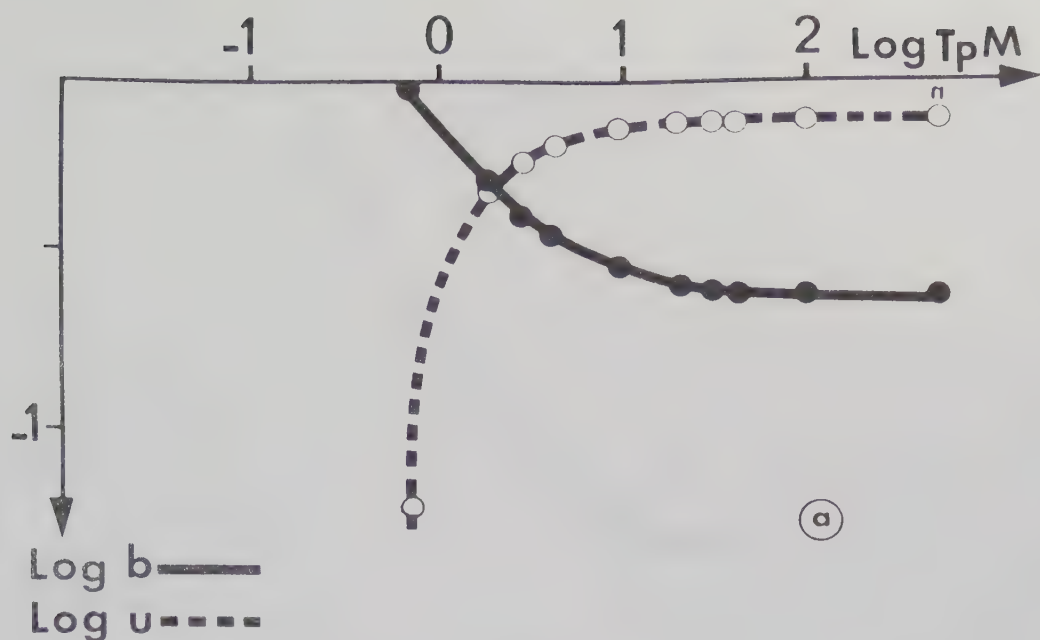


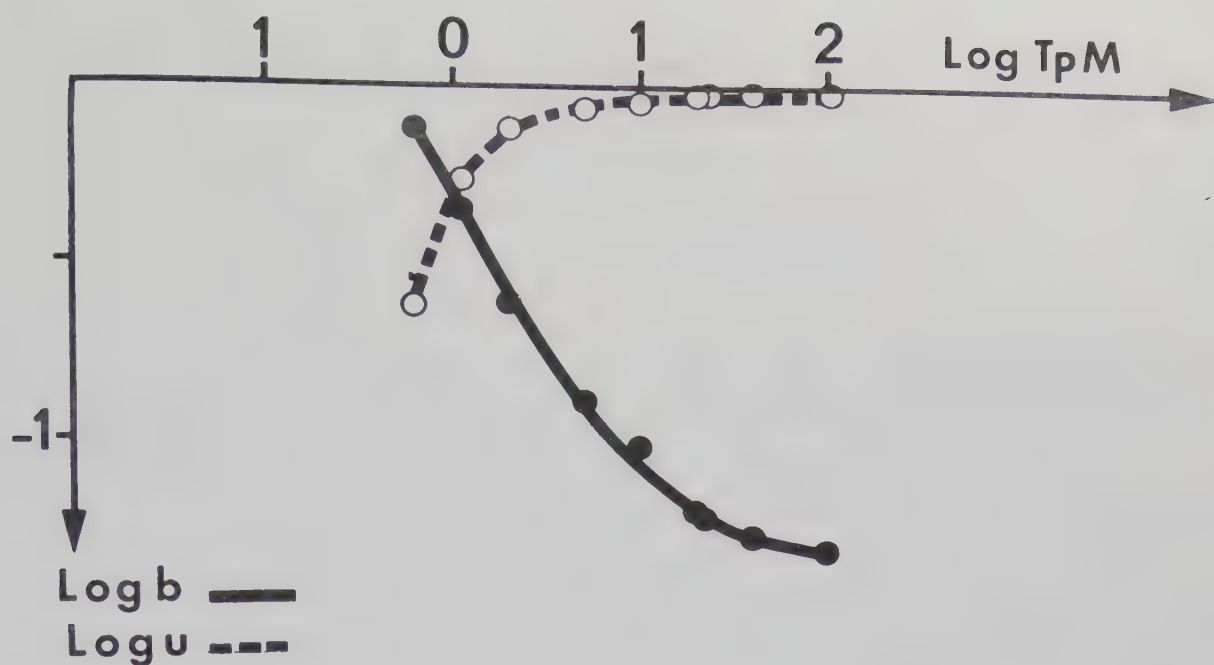
Fig. 15 - LIAISON DE L'OESTRADIOL A UNE PROTEINE NUCLEAIRE

a - Graphique proportionnel pour la préparation n° 2.

La forme de la courbe indique que tous les points expérimentaux sont déjà proches de la saturation. En effet, le plateau initial n'est pas observé.

b - Représentation graphique de B vs U .

L'asymptote se situe dans la région positive de U car la fonction suit la branche de l'hyperbole située dans le premier quadrant. Ce résultat correspond à la meilleure courbe obtenue par ordinateur. Il est la conséquence de l'imprécision des points expérimentaux, tous situés dans la région de la saturation.



	Exp 1	Exp 2	Exp 3
$N_s 10^{-12} M$	3.43 ± 0.17	0.65 ± 0.03	0.48 ± 0.01
$1/K_s 10^{-12} M$	0.29 ± 0.05	-0.016 ± 0.02	0.0041 ± 0.0038
$K_{ns} N_{ns}$	0.24 ± 0.02	0.30 ± 0.001	0.045 ± 0.005

Fig. 16 - LIAISON DE L'OESTRADIOL A UNE PROTEINE NUCLEAIRE
Graphique proportionnel pour la préparation n° 3.

La plus faible concentration est également saturante.

Tableau de résultats résumant les trois expériences.

Dans les expériences 2 et 3 la précision sur $1/K_s$ peut conduire à une valeur nulle de ce paramètre, c'est-à-dire, à une constante intrinsèque d'association infinie. Au cours de ces trois expériences cette constante est très élevée tandis que la concentration des sites est très faible. La concentration en protéines de ces préparations est respectivement 1,3, 1,3 et 0,5 mg/ml.

un sens, il est nécessaire d'augmenter la précision sur chaque point expérimental. Les résultats obtenus dans ces conditions très rigoureuses permettent de calculer une valeur de $250 \times 10^{12} \text{M}^{-1}$ pour la constante d'affinité.

Les résultats des trois expériences sont résumés dans le tableau de la figure 16.

On peut en déduire que, dans les trois conditions expérimentales, la valeur de K_S est, en tenant compte des limites d'erreur, supérieure à une valeur minimum de 10^{12}M^{-1} .

Cette liaison nucléaire de l'oestradiol présente toutes les caractéristiques d'un système spécifique. Elle se différencie cependant de la liaison cytoplasmique de plusieurs façons : la forte affinité de l'interaction nucléaire est remarquablement plus élevée que celle de l'interaction cytoplasmique. Le nombre de sites de liaison nucléaire est au moins 100 fois plus faible que celui des sites de liaison cytoplasmique, pour une même concentration de protéines. On ne peut toutefois pas exclure une interaction irréversible, car dans les trois cas, la valeur supérieure de la constante peut être l'infini. En effet, tous les points expérimentaux se situent au-delà de la saturation du système spécifique et les rares cas où leur valeur est plus faible conduisent à une liaison de 100 % (exemple des 2 points éliminés pour la première préparation). Dans la deuxième préparation $\frac{1}{K_S}$ est négatif donc a fortiori peut être nul ce qui ici encore correspond à une valeur de K_S infini et dans la troisième préparation la limite supérieure calculée à partir de l'écart-type est également compatible avec K_S infini.

CONCLUSION

Comme le montre cette première partie, la réponse aux questions "combien de molécules se lient et avec quelle force" ou en d'autres termes l'analyse quantitative des interactions stéroïdes-protéines nécessite plusieurs conditions. En effet, les exemples d'application du 3ème *Chapitre* mettent en évidence l'importance d'un choix judicieux d'une technique de mesure appropriée et d'une représentation graphique adaptée.

- La technique de mesure choisie doit éviter les phénomènes de dissociation des complexes dont on veut mesurer les constantes de la liaison. La difficulté d'application pratique de la technique n'intervient que secondairement. A la rapidité de certaines techniques, doit être préférée la sûreté de certaines autres, peut-être moins élégantes mais certainement plus éprouvées comme la dialyse à l'équilibre utilisée dans les expériences décrites. Dans certains cas particuliers où la liaison spécifique est masquée par la liaison non spécifique, les paramètres ne peuvent être calculés que d'une manière approximative, et seule une purification de la protéine conduirait à une analyse plus précise.

- La représentation graphique doit être adaptée au phénomène étudié. En effet, si les protéines liantes ne sont pas purifiées, les interactions ne sont correctement analysées que si le domaine de variation de la concentration du ligand est très large ; l'emploi de coordonnées linéaires devient impossible, car la représentation graphique doit visualiser le phénomène complexe de la liaison, c'est-à-dire indiquer quels types de liaison entrent en jeu en différenciant la liaison spécifique de la liaison non spécifique. L'allure de la fonction détermine le choix d'un modèle que l'ordinateur doit confirmer par une analyse statistique. Ceci permet de vérifier les hypothèses initiales, comme : l'interaction obéit-elle à la loi d'action de masse, ou, la protéine est-elle purifiée, ou, plusieurs groupes de protéines liantes sont-ils présents, ou, plusieurs ligands sont-ils compétiteurs pour le même site de fixation ? Si une extrapolation est nécessaire pour calculer la valeur des paramètres, seul un bon modèle en permet l'analyse précise. De plus, la solution mathématique apporte, en général, une information très utile pour la conception d'expériences ultérieures. Dans cette méthode graphique, la décomposition de la fonction en ses composantes, permet de connaître, pour une concentration donnée de ligand, la distribution du ligand entre sa fraction libre et sa fraction liée aux différentes protéines.

2ème PARTIE

DISTRIBUTION ET ACTION DE DERIVES DE L'OESTRADIOL

Dans cette deuxième partie, les deux autres questions "où et pourquoi" sont envisagées. De nombreuses hypothèses suivies de vérifications expérimentales, permettent d'entrevoir le rôle joué par les interactions stéroïdes-protéines dans le mécanisme d'action des hormones. Pour cette raison, une revue de ces hypothèses fait l'objet de l'introduction de cette partie consacrée à un exemple d'application : le mécanisme d'action des oestrogènes, domaine où de nombreux travaux ont permis de vérifier le rôle primordial des interactions stéroïdes-protéines.

INTRODUCTION (*)

Les études, *in vivo* et *in vitro*, du mécanisme d'action de l'oestradiol sont particulièrement orientées vers la mise en évidence et l'importance des récepteurs cytoplasmiques et nucléaires.

(*) Certains résultats exposés dans cette partie ont été publiés.

J.P. RAYNAUD (1969). A Model for the Mode of Action of Estrogenic Compounds. In : Fourth Int. Congr. on Pharmacology, BASEL, 1969, Abstracts, p. 451.

J.P. RAYNAUD, G. AZADIAN-BOULANGER, D. BOURQUIN et D. PHILIBERT (1970b) : Réalisation d'un modèle pharmacodynamique pour l'étude du mode d'action des oestrogènes au moyen de composés radioactifs. Symposium sur les progrès des techniques nucléaires en Pharmacodynamie. SACLAY, (1970) G. Valette et Y. Cohen, eds., Masson, Paris, 35.

D. BOURQUIN, G. AZADIAN-BOULANGER, D. PHILIBERT and J.P. RAYNAUD (1970) : R 2858, a Highly Potent Estrogenic Compound. In : Third Int. Congr. on Hormonal Steroids, HAMBURG, 1970, Excerpta Med. International Congress Series, 210, 151.

Au cours d'expériences *in vivo*, *Glascock et Hoekstra* ont eu, les premiers, le mérite en 1959, de mettre en évidence l'accumulation sélective de l'hexoestrol, marqué au tritium avec une très forte activité spécifique, par les organes cibles de la brebis. *Jensen et Jacobson* (1960, 1962) ouvrent la voie à de nombreuses recherches en étudiant la fixation tissulaire des hormones endogènes, l'oestradiol 17 β et l'oestrone, injectées à des doses physiologiques. Ils montrent que l'utérus et le vagin de la rate impubère accumulent plus de tritium que les tissus non cibles et précisent que seul l'oestradiol 17 β est fixé préférentiellement dans l'utérus. Les résultats de l'incorporation d'oestradiol tritié par les tissus cibles ou non cibles, après injection intraveineuse à des souris ovariectomisées, *Stone, Bagget et Donnelly* (1963a) sont similaires à ceux de *Jensen et Jacobson* chez le rat. *Stone* (1963b) compare la captation après une injection sous-cutanée de stéroïde dissout dans l'huile ou dans le sérum physiologique et montre qu'elle est plus rapide dans le cas du sérum physiologique. *Stone et Martin* (1964) et *Pollard et Martin* (1967) mesurent la fixation de l'oestradiol et de l'oestrone par l'utérus de la souris ovariectomisée après application locale, et par la même technique, *Stone et Bagget* (1965a) démontrent la spécificité hormonale de cette rétention. *Folman et Pope* (1969) étudient l'effet de différentes doses d'oestradiol sur la fixation et le poids des organes cibles chez la souris impubère, et *Terenius* (1965), l'effet de différents stéroïdes sur la fixation de l'oestradiol. *Brecher et Wotiz* (1967b) notent un effet compétitif entre estriol et oestradiol pour la fixation dans l'utérus de rate.

La distribution et l'accumulation de radioactivité dans d'autres tissus, après injection de doses physiologiques d'oestrogènes tritiés, sont étudiées par *Folca, Glascock et Irvine* (1961) et *Braunsberg et James* (1967). *Steinetz, Meli, Giannina, Beach et Manning* (1967) montrent le stockage préférentiel du Quinestrol dans les graisses. Le tissu mammaire de la rate *King, Gordon, Cowan et Inman* (1966a), *Sander* (1968), *Deshpande, Jensen et Bulbrook* (1967) accumule l'oestradiol, et certaines cellules des ganglions autonomes de la souris, le fixent également, *Carr et Williams* (1969). Le contrôle du niveau des oestrogènes se faisant dans l'hypothalamus et dans l'hypophyse,

Au cours d'expériences *in vivo*, *Glascock et Hoekstra* ont eu, les premiers, le mérite en 1959, de mettre en évidence l'accumulation sélective de l'hexoestrol, marqué au tritium avec une très forte activité spécifique, par les organes cibles de la brebis. *Jensen et Jacobson* (1960, 1962) ouvrent la voie à de nombreuses recherches en étudiant la fixation tissulaire des hormones endogènes, l'oestradiol 17 β et l'oestrone, injectées à des doses physiologiques. Ils montrent que l'utérus et le vagin de la rate impubère accumulent plus de tritium que les tissus non cibles et précisent que seul l'oestradiol 17 β est fixé préférentiellement dans l'utérus. Les résultats de l'incorporation d'oestradiol tritié par les tissus cibles ou non cibles, après injection intraveineuse à des souris ovariectomisées, *Stone, Bagget et Donnelly* (1963a) sont similaires à ceux de *Jensen et Jacobson* chez le rat. *Stone* (1963b) compare la captation après une injection sous-cutanée de stéroïde dissout dans l'huile ou dans le sérum physiologique et montre qu'elle est plus rapide dans le cas du sérum physiologique. *Stone et Martin* (1964) et *Pollard et Martin* (1967) mesurent la fixation de l'oestradiol et de l'oestrone par l'utérus de la souris ovariectomisée après application locale, et par la même technique, *Stone et Bagget* (1965a) démontrent la spécificité hormonale de cette rétention. *Folman et Pope* (1969) étudient l'effet de différentes doses d'oestradiol sur la fixation et le poids des organes cibles chez la souris impubère, et *Terenius* (1965), l'effet de différents stéroïdes sur la fixation de l'oestradiol. *Brecher et Wotiz* (1967b) notent un effet compétitif entre estriol et oestradiol pour la fixation dans l'utérus de rate.

La distribution et l'accumulation de radioactivité dans d'autres tissus, après injection de doses physiologiques d'oestrogènes tritiés, sont étudiées par *Folca, Glascock et Irvine* (1961) et *Braunsberg et James* (1967). *Steinetz, Meli, Giannina, Beach et Manning* (1967) montrent le stockage préférentiel du Quinestrol dans les graisses. Le tissu mammaire de la rate *King, Gordon, Cowan et Inman* (1966a), *Sander* (1968), *Deshpande, Jensen et Bulbrook* (1967) accumule l'oestradiol, et certaines cellules des ganglions autonomes de la souris, le fixent également, *Carr et Williams* (1969). Le contrôle du niveau des oestrogènes se faisant dans l'hypothalamus et dans l'hypophyse,

leur accumulation, dans ces organes est recherchée chez le rat Kato et Villee (1967a , 1967b), Eisenfeld et Axelrod (1967a), Kato, Kobayashi et Villee (1968), Green, Luttge et Whalen (1969), Wooley, Holinka et Timiras (1969), Attramadal (1969), Kato, Inaba et Kobayashi (1969), McGuire et Lisk (1969), Presl, Röhling, Horsky et Herzmann (1970), Whalen et Luttge (1970).

Ces travaux sur la distribution tissulaire des oestrogènes sont complétés par des recherches sur la localisation cellulaire et intracellulaire des sites de fixation. Alberga et Baulieu (1965), Flesher (1965) et de Hertogh (1970) mettent en évidence la fixation préférentielle par l'endomètre de l'utérus du rat et Brush, Taylor et King (1967) par celui de la femme. King et Gordon (1966b) évaluent la distribution intracellulaire de l'oestradiol dans l'utérus de rat et King, Gordon et Martin (1968a) dans le vagin de la souris. Noteboom et Gorski (1965) recherchent la fixation de l'oestradiol et de différents stéroïdes dans les fractions subcellulaires de l'utérus de rat et déterminent la stéréospécificité de leur fixation. Inman, Banfield et King (1965), Pfaff (1968), Stumpf (1968, 1969), Anderson et Greenwald (1969) étudient, par autoradiographie, des fixations préférentielles de radioactivité dans certaines régions de l'hypothalamus ou de l'hypophyse.

Au cours d'expériences tissulaires *in vitro* par Stone et Baggett (1965b), Jensen, Desombre et Jungblut (1966a), Jensen, Jacobson, Flescher, Suha, Gupta, Smith, Colluci, Shiplacoff, Neuman, Desombre et Jungblut (1966b), Terenius (1966, 1968a,b), Alberga et Baulieu (1968), Rochefort et Baulieu (1969) la spécificité oestrogénique de la fixation, la compétition entre différents oestrogènes pour le même site de fixation, et la rétention de ces hormones par l'organe incubé sont montrées. Toutefois, la nature protéique de la molécule fixant le stéroïde est précisée seulement par des expériences *in vitro* de type acellulaire. Talwar, Segal, Evans et Davidson (1964), Toft et col (1967), Baulieu et col (1967a,b) démontrent dans la fraction soluble par centrifugation 1 h à 105000 g d'un broyat d'utérus de rats, la présence d'une protéine qui possède la même spécificité hormonale que celle trouvée dans les expériences précédentes. Par centrifugation en gradient de sucrose, ils déterminent son coefficient de sédimentation de l'ordre de 8-10S;

si de fortes concentrations d'oestradiol sont utilisées, l'oestradiol sédimente également dans la région "4-5 S". *Talwar, Sopori, Biswas et Segal (1968)* précisent la nature et les caractéristiques du récepteur cytoplasmique, tandis que *Wyss, Heinrichs et Hermann (1968)* étudient les différences entre espèces. La constante intrinsèque d'association et la concentration des sites de ce récepteur sont étudiées par *Toft et coll. (1967)*, *Baulieu et Raynaud (1969)*, *Gorski et coll. (1968)*, *Erdos (1968a)*, *Erdos, Gospodarowicz, Bessada et Fries (1968b)*, *Korenman et Rao (1968b)*, *Puca et Bresciani (1969)*, *Best Belpomme, Friès et Erdos (1970)*. En augmentant la force ionique, le récepteur cytoplasmique se dissocie et son coefficient de sédimentation devient "4 S". Il peut se réassocier en "8 S" en diminuant la force ionique, *Erdos (1968a)*, *Korenman et Rao (1968b)*, *Rocheffort et Baulieu (1968)*, *Jensen, Suzuki, Numata, Smith et Desombre (1969)*. Zn^{++} , Ca^{++} , K^+ , Mg^{++} et Mn^{++} augmentent la liaison de l'oestradiol *Emmanuel et Oakey (1969)*. *Desombre, Puca et Jensen (1969)* ont commencé à purifier le récepteur sous la forme "4 S". L'interaction de l'oestradiol avec un récepteur nucléaire de coefficient de sédimentation "5 S" est également mise en évidence par *Brecher, Vigersky, Wotiz et Wotiz (1967)*, *Maurer et Chalkley (1967)*, *Brecher et Wotiz (1968)*, *Gorski et coll. (1968)*, *Jensen et coll. (1968)*, *King et Gordon (1968b)*, *Puca et Bresciani (1968, 1969)*, *Brecher, Pasquina et Wotiz (1969)*, *King, Gordon et Steggles (1969)*, *Baulieu, Alberga, Jung, Lebeau, Mercier-Bodard, Milgrom, Raynaud, Raynaud-Jammet, Rocheffort, Truong-Richard-Foy, et Robel (1971)*.

De l'ensemble de ces recherches, il ressort que tout composé utéro-trophique doit interagir avec ces récepteurs. Par exemple : *Raynaud-Jammet et Baulieu (1969)* n'obtiennent une activité oestrogénique sur la synthèse d'acide ribonucléique par les noyaux utérins "in vitro", pour autant qu'une préparation de récepteurs cytosolubles intacts soit ajoutée au milieu d'incubation. L'interaction agit comme un système tout ou rien, c'est-à-dire que si elle se produit, toutes les modifications biochimiques qui déterminent la réponse biologique ont lieu inéluctablement. L'étude de ces modifications comme : augmentation du débit sanguin dans l'utérus *Kalman (1958a)* augmentation de la perméabilité vasculaire *Cecil, Hannum et Bitman (1966)*, *Friederici (1967)*, entrée de l'albumine et du

sodium *Kalman et Lowenstein (1958b)*, *Peterson et Spaziani (1969)*, imbibition aqueuse *Astwood (1938)*, *Cole (1950)*, stimulation de la synthèse des phospholipides *Aizawa et Mueller (1961)*, de la synthèse des acides ribonucléiques et des protéines *Gorski et Mueller (1963a)*, *Gorski et Nicolette (1963b)*, *Hamilton (1963)*, *Mueller, Gorski et Aizawa (1963)*, *Noteboom et Gorski (1963)*, *Ui et Mueller (1963)*, *Gorski (1964)*, *Notides et Gorski (1966)*, *Hamilton, Widnell et Tata (1968)*, permet de préciser l'effet physiologique des oestrogènes sur le développement de la muqueuse utérine ou, activité utérotrrophique, comme la définissent *Dorfman et Dorfman (1954)*, *Emmens et Martin (1964)*. Mais l'étude de ces modifications ne donne aucune indication sur le contrôle de cette activité biologique par le système tout ou rien qu'est l'interaction de l'hormone avec sa protéine réceptrice dans l'organe cible. Cette activité peut également être modulée par l'interaction des stéroïdes avec d'autres protéines comme, par exemple, les protéines plasmatiques. Une approche du mode d'action des oestrogènes doit tenir compte de ces diverses interactions dans le but de dégager une relation entre fixation sur les protéines et activité biologique. Enfin, d'autres paramètres peuvent aussi moduler cette réponse et il est nécessaire, non seulement de considérer les interactions entre le stéroïde et une ou plusieurs macromolécules, mais aussi de suivre le destin du stéroïde dans l'organisme entier.

En prenant en considération toutes les notions décrites dans cette introduction, il est possible de concevoir un modèle pharmacodynamique schématisé sur la figure 17. La vérification de ce modèle définit le plan de la deuxième partie qui se divise en quatre chapitres.

1 - Réponse biologique (R.B.)

Pour un ensemble homogène de dérivés de l'oestradiol et de l'éthynyloestradiol, la réponse, exprimée par le poids de l'utérus, est évaluée, par les techniques classiques de biologie.

2 - Captation du stéroïde

La captation du stéroïde dans l'organe cible est mesurée afin de mettre en évidence une relation entre la présence du stéroïde et son activité biologique.

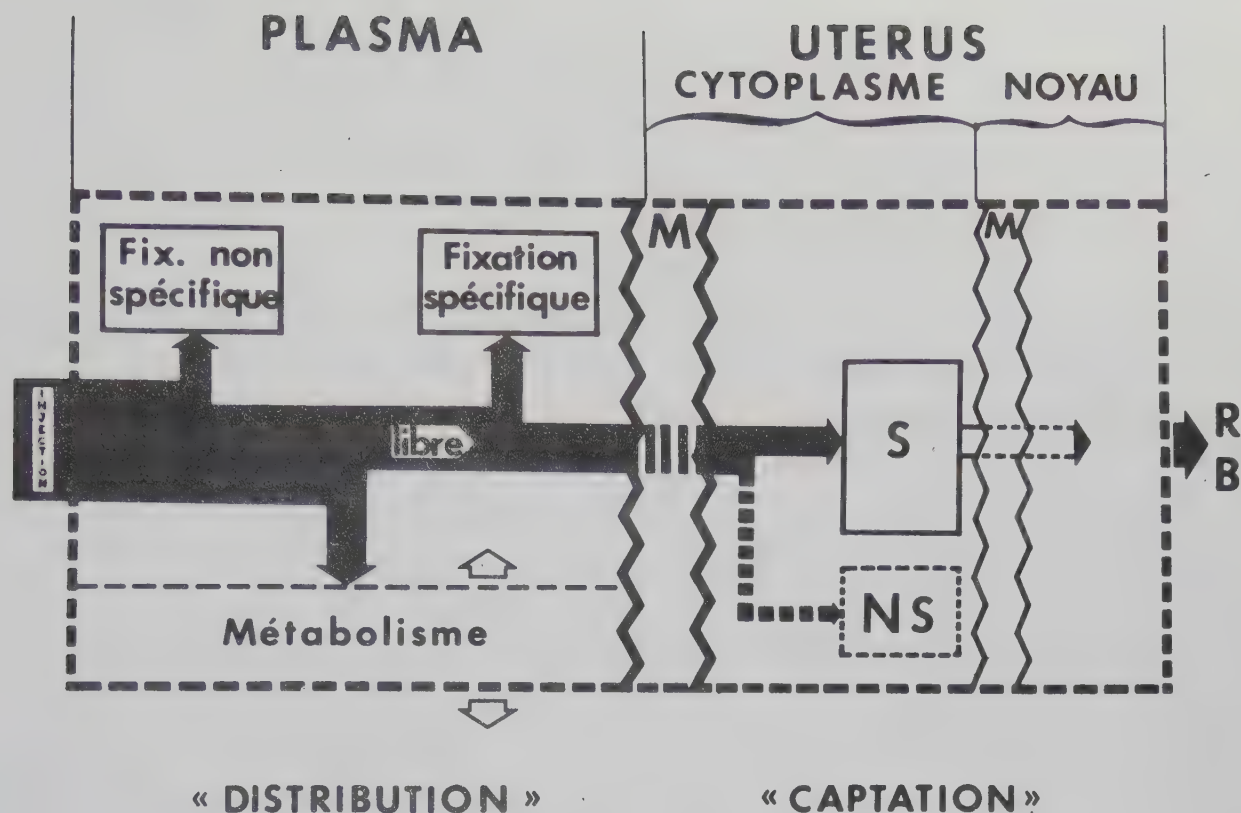


Fig. 17 - MODELE PHARMACODYNAMIQUE

Ce modèle sert à montrer le devenir de l'oestrogène depuis son injection dans le plasma jusqu'à sa fixation dans l'utérus. Le stéroïde dans le plasma se "distribue" entre sa fraction libre, et ses fractions liées, spécifique et non spécifique. Cette distribution inclut également le métabolisme qui peut conduire à la transformation du stéroïde en un produit actif (flèche vers le haut) ou en un produit inactif (flèche vers le bas). Ensuite, le stéroïde traverse des membranes biologiques pour être "capté" dans le cytoplasme des cellules de l'utérus par des protéines spécifiques S (récepteur) et non spécifiques NS. Cette fixation sur la protéine S déclenche toute la séquence d'événements biochimiques conduisant finalement à la réponse biologique R.B.

3. - Métabolisme

La nature de la radioactivité captée peut être due au produit initial, à un métabolite actif ou inactif. Ce point est donc vérifié par une étude du métabolisme des dérivés utilisés.

4 - Sites de fixation des oestrogènes

- Au niveau tissulaire, les protéines cytosolubles possédant la spécificité hormonale et tissulaire requise pour induire la réponse biologique sont recherchées.

- Au niveau plasmatique, les interactions de ces stéroïdes avec les protéines plasmatiques sont également mesurées afin de mettre en évidence la modulation par ces protéines de la réponse biologique.

A partir de ces résultats, la relation structure-activité est discutée.

1ER CHAPITRE

REPOSE BIOLOGIQUE

Avant d'aborder l'étude du mécanisme d'action des différents stéroïdes représentés sur la figure 18, il est nécessaire d'évaluer leur activité biologique. L'activité biologique est, dans un premier temps, mesurée par les essais classiques et les résultats sont ensuite comparés à des essais dynamiques.

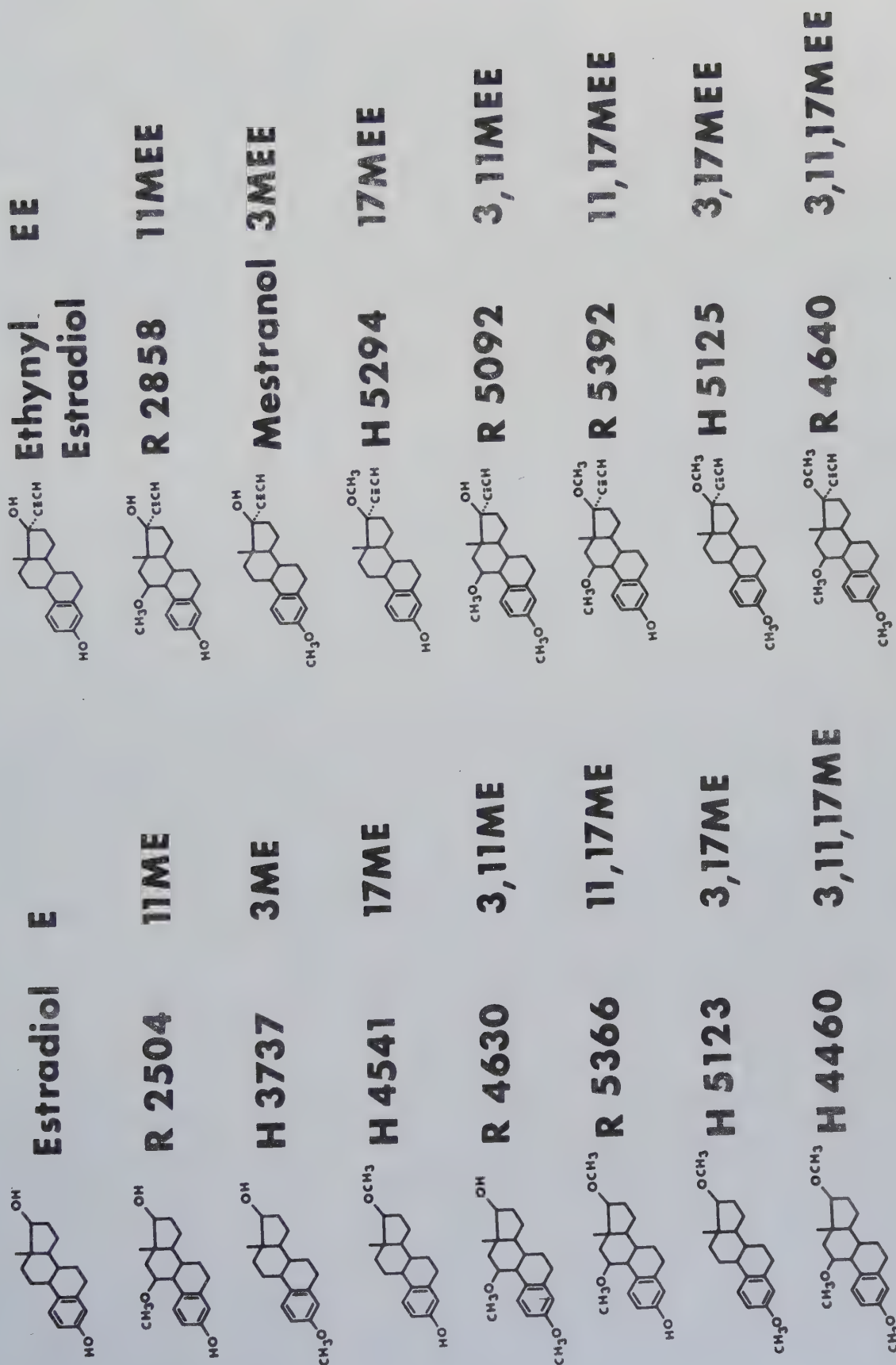


Fig. 18 - FORMULE, NOM OU NUMERO DE NOMENCLATURE ET ABREVIATIONS DES 16 DERIVES ETUDES

STEROIDES

Tous les stéroïdes représentés sur la figure 18 sont synthétisés et marqués au tritium en position 6, 7, dans les laboratoires de Recherches Roussel-Uclaf. Ils ont une activité spécifique d'environ 40 C/mM. Ces composés sont des dérivés méthoxylés en 11 β et méthylés en 3 ou 17, soit de l'oestradiol, soit de l'éthynyloestradiol. Leur formule ainsi que leur numéro de nomenclature Roussel-Uclaf sont indiqués sur la figure. Les abréviations suivantes sont utilisées dans le texte :

E : oestradiol ; EE : éthynyloestradiol ;
M : méthoxyle ou méthyle.

La (ou les) position de la substitution par un méthoxyle (ou un méthyle) est indiquée par un ou plusieurs chiffres. Ainsi, par exemple, le 3 méthyl, 11 méthoxy, oestradiol s'écrit : 3,11 ME.

EXPERIENCES BIOLOGIQUES

ACTIVITE UTEROTROPHIQUE CHEZ LA SOURIS

Rubin, Dorfman, Black et Dorfman (1951)

Des doses croissantes de composé sont administrées, soit par voie sous-cutanée (*voie sc*), soit par voie buccale (*per os*), 1 fois par jour, pendant 3 jours, à des souris impubères (souche Swiss SPF - IFFA-CREDO - Les Oncins) âgées de 18-19 jours, et pesant environ 15 g. Les témoins reçoivent le solvant seul. Les animaux sont sacrifiés 24 heures après la 3ème administration et les utérus prélevés et pesés. L'augmentation du poids utérin sert de critère pour mesurer l'activité utérotrrophique du produit. Chaque point est la moyenne de 5 souris.

Solvants (0,1 ml/souris)

- voie sc :
 - . Huile de sésame + 5 % alcool benzylique
 - . Eau + 10 % alcool éthylique
- per os :
 - . Huile de sésame.

ACTIVITE UTEROTROPHIQUE CHEZ LA RATE

Lauson, Heller, Golden et Severinghaus (1939)

Des doses croissantes de composé sont administrées par voie sous-cutanée, 1 fois par jour, pendant 3 jours, à des rates impubères, (souche Wistar - Elevage Centre de Recherches Roussel-Uclaf) âgées de 19-21 jours, et pesant environ 35-40 g. Les témoins reçoivent le solvant seul. Les animaux sont sacrifiés 24 heures après la 3ème administration et les utérus sont prélevés et pesés. L'augmentation du poids utérin sert de critère pour mesurer l'activité utérotrrophique du produit. Chaque point est la moyenne de 5 rates.

Solvants (0,1 ml/rate)

voie sc : Eau + 10 % alcool éthylique.

ACTIVITE UTEROTROPHIQUE "DYNAMIQUE" APRES INJECTION UNIQUE

Hisaw (1959)

Le stéroïde radioactif, en solution dans 0,5 ml de sérum physiologique (contenant 10 % d'éthanol), est injecté, par voie intraveineuse à des rates Wistar âgées de 19-21 jours, à la dose de 0,1 µg. Les témoins reçoivent le solvant seul. Les animaux sont décapités à des temps différents, allant de 0 à 72 heures après l'injection, et leur sang recueilli sur héparine. Les utérus sont ensuite rapidement prélevés et pesés. La radioactivité, captée par l'utérus, est mesurée après broyage de celui-ci dans 0,5 ml de sérum physiologique au moyen d'un homogénéiseur verre-verre. Le broyat est ensuite suspendu dans un liquide scintillant (6 ml de toluène, 4 ml d'éthylèneglycol monométhyléther, 0,8 g de naphtalène et 0,04 g de butyl PBD (Ciba)) et compté dans un spectromètre à scintillation liquide (modèle Packard 3375). Le "Quenching" est déterminé par la méthode du standard externe et les résultats, perforés sur bande de papier, sont traités au moyen d'un système en temps partagé (Rax IBM). Ainsi, l'augmentation du poids de l'utérus et la quantité de radioactivité captée par l'organe cible, peuvent être représentés simultanément en fonction du temps. Chaque point est la moyenne de 5 déterminations. Le poids des

utérus d'animaux témoins est soustrait de cette moyenne.

Un index d'activité P est défini pour estimer l'activité de ces composés et comparer leurs activités entre elles. Il est calculé par ordinateur à partir de la surface déterminée par la courbe d'augmentation du poids entre 0 et 72 h et l'axe des abscisses. La valeur 1 correspond à l'oestradiol.

RESULTATS

L'activité oestrogénique est évaluée par de nombreux auteurs à partir de ces deux premiers tests *Dorfman et Kinel* (1966) et l'évaluation des résultats fait l'objet d'approches diverses *Dorfman et Dorfman* (1954), *Emmens* (1962). Cette activité obtenue pour les différents composés est indiquée dans le tableau 1. Elle est définie arbitrairement par la dose totale exprimée en μg , nécessaire pour multiplier par 5 le poids de l'utérus. Cette dose est déterminée à partir des courbes dose-réponse. Cependant, le facteur d'augmentation de poids de l'utérus pour la série oestradiol (test de *Lauson*) est choisi égal à 2,5. En effet, la courbe dose-réponse de l'oestradiol ne permet pas une mesure pour une valeur supérieure. Un exemple de cette méthode de représentation et de calcul est donné sur la figure 19.

Dans la série oestradiol, l'augmentation de l'activité par rapport à celle de l'oestradiol, n'est observée que pour le dérivé 11 méthoxylé. La méthylation en 3 ou 17, se traduit par une perte d'activité. Il est intéressant de noter que si les stéroïdes sont substitués en 2 positions différentes, le méthoxyle en 11 leur confère la plus forte activité. Si l'on compare les valeurs obtenues (*sc*), par le test de *Lauson* ou celui de *Rubin*, il n'apparaît pas de variation très importante à l'exception du 3 ME, beaucoup plus actif chez le rat que chez la souris. Par contre, les valeurs après administration *per os* sont très différentes : par cette voie, l'oestradiol est beaucoup moins actif que par voie sous-cutanée, alors que la substitution par un méthoxyle minimise la différence d'activité entre les 2 voies pour un même composé. Ce dernier effet est encore

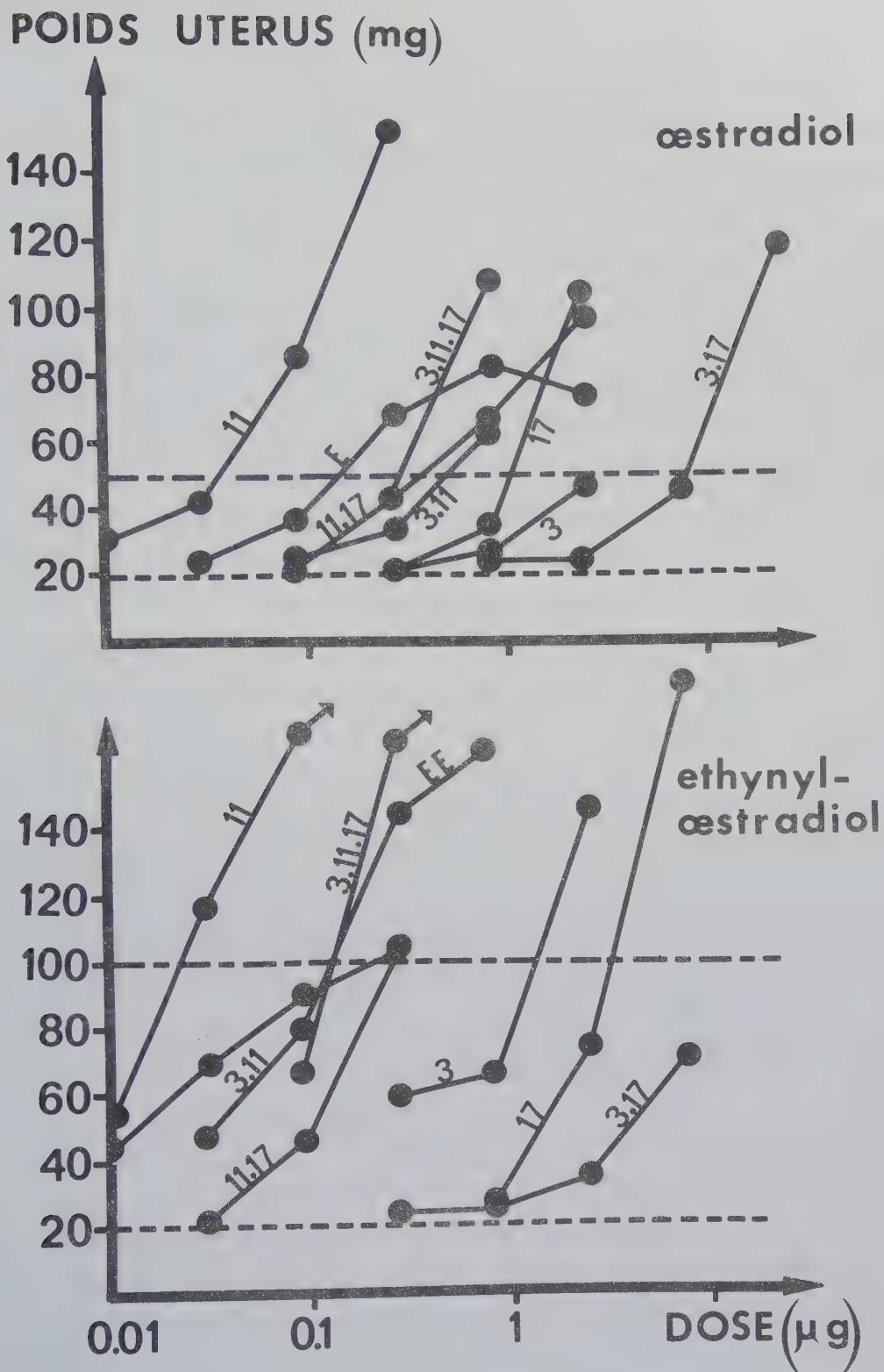


Fig. 19 - 'ACTIVITE UTEROTROPHIQUE - TEST DE LAUSON

Les courbes dose-réponse sont tracées pour les 16 produits. Chaque point est la moyenne du poids de l'utérus de 5 rates traitées par voie sous-cutanée. La dose totale est indiquée en abscisse, (échelle logarithmique). Les lignes pointillées horizontales correspondent, pour la ligne inférieure au poids de l'utérus des témoins, et pour la ligne supérieure au niveau arbitraire permettant par l'intersection avec les courbes dose-réponse, d'estimer l'activité utérotrrophique.

plus marqué lorsque tous les hydroxyles sont méthylés et, à la limite, le composé devient alors plus actif lorsqu'il est administré par *voie orale* plutôt que par *voie sous-cutanée*.

Dans la série éthynyloestradiol, l'ensemble des composés étudiés possède une activité plus forte que dans la série oestradiol. La différence entre espèces et mode d'administration est très peu marquée. Les dérivés méthoxylés en position 11 se révèlent les plus actifs. Après administration *per os*, les stéroïdes di ou triméthoxylés présentent les mêmes caractéristiques que dans le cas précédent.

La réponse utéro-trophique en fonction du temps est représentée, pour les 16 composés, sur les figures 20 et 21. Pour certains d'entre eux, la réponse est nulle après injection de 0,1 µg ; leur étude est cependant nécessaire car un composé inactif, faisant partie d'une série bien déterminée, apporte autant d'informations qu'un composé actif pour la compréhension du mécanisme d'action : topologie du site, effets stériques, localisation des groupes réactifs.

Les courbes d'augmentation du poids de l'utérus, montrent que, pour la dose de 0,1 µg, seuls les dérivés méthoxylés en 11 possèdent une activité biologique importante et souvent supérieure aux deux composés de base, E et EE. Il est également intéressant de remarquer que la réponse dans la série éthynyloestradiol, est, en général, plus forte que celle observée dans la série oestradiol. La principale raison en est le métabolisme différent pour les deux séries : le groupement alcool secondaire en 17 de l'oestradiol devient, après substitution en 17 par un éthyne, un alcool tertiaire. Beaucoup plus difficilement oxydable, il empêche la formation d'une cétone, donc d'un composé moins actif. Les valeurs d'activité utéro-trophique, exprimées par l'index P, sont comparables à celles obtenues par les deux méthodes précédentes (voir tableau I). Cette technique permet de suivre l'évolution de la réponse, et de noter, par exemple, un effet retard par déplacement vers la droite du maximum de la courbe réponse-temps.

	RUBIN s.c huile	RUBIN s.c eau	RUBIN per os huile	LAUSON s.c eau	P
E	0,15	1,5	8	0,15	1
11 ME	0,1	0,07	0,4	0,04	2,1
3 ME	4	9	6	3,0	0,2
17 ME	3		8	1	0,1
3,11 ME	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
11,17 ME	0,4	2	1	0,5	0,8
3,17 ME	4	5	2	8	0,1
3,11,17 ME	0,8	0,3	0,3	0,3	0,5
EE	0,06	0,07	0,5	0,15	1,4
11 MEE	0,06	0,04	0,4	0,02	2,5
3 MEE	0,7	0,7	0,9	1,3	0,5
17 MEE	1,2	2	3	3	0,1
3,11 MEE	0,1	0,07	0,2	0,2	2,3
11,17 MEE	0,4	0,3	0,4	0,25	2,4
3,17 MEE	1,2	8	0,6	15	0,2
3,11,17 MEE	0,8	0,2	0,3	0,15	2,0

TABLEAU 1 - Le chiffre indiqué dans les 4 premières colonnes correspond à la dose totale exprimée en µg, nécessaire pour multiplier par 5 le poids de l'utérus, à l'exception du Test de Lauson pour la série E, où le facteur 2,5 est utilisé. Les chiffres de la colonne P correspondent à la surface déterminée par la courbe d'augmentation du poids entre 0 et 72 heures et l'axe des abscisses. Les valeurs sont exprimées par rapport à E.

2^{EME} CHAPITRE

CAPTATION DU STEROIDE

La détermination de l'activité utérotrrophique "dynamique" de ces oestrogènes de synthèse après injection d'une dose unique, peut, s'ils sont radioactifs, servir de mesure pour la captation de ces composés par l'organe cible. Les études de captation de doses actives d'oestrogènes radioactifs permettent de rechercher s'il existe une relation entre réponse utérotrrophique et accumulation de la radioactivité *in situ* et s'il existe des accumulations préférentielles dans d'autres organes. Le lieu et le mode d'administration jouent un rôle très important et déterminent finalement la distribution du produit. En effet, selon le lieu d'administration, la courbe de captation en fonction du temps présente des allures différentes. Une injection intraveineuse se traduit par une concentration toujours décroissante de la radioactivité dans le plasma en fonction du temps. Une administration par voie orale, conduit à une courbe plasmatique présentant un maximum d'autant plus tardif que le passage du stéroïde de son lieu d'administration jusque dans le plasma est retardé. Il semble plus logique

d'étudier la distribution après administration intraveineuse qui élimine ce problème de passage. Le mode d'administration est plus difficile à choisir. En effet, l'injection et la perfusion continue présentent, à la fois, des avantages et des inconvénients. Comme le mentionne *Pearlman (1964)*, seule, la perfusion permet d'atteindre un état d'équilibre semblable à celui qui existe dans l'organisme, dans les conditions physiologiques. Cette méthode permet de mesurer à l'équilibre les différences de concentrations entre différents organes *Braunsberg et James (1967)*, *De Hertogh, Ekka, Vanderheyden et Hoet (1969)*. Cependant l'injection présente d'autres avantages dans le cas où la dose injectée est une dose traceuse, c'est-à-dire une quantité injectée faible par rapport à la quantité d'hormone endogène, ou dans le cas d'un stéroïde de synthèse exclusivement exogène. Elle permet, en effet, d'analyser les courbes de disparition par la théorie des compartiments et de différencier courbe de disparition et courbe de rétention.

REPONSE BIOLOGIQUE ET CAPTATION

Les stéroïdes radioactifs (0,1 μ g en solution dans du sérum physiologique) sont injectés par voie intraveineuse à des rates Wistar impubères âgées de 19-21 jours. Ces expériences sont identiques à celles qui ont permis de mesurer la réponse dynamique décrite dans le chapitre précédent. La captation de radioactivité est exprimée par la mesure par ordinateur de la surface délimitée par la courbe de radioactivité en fonction du temps, entre 0 et 72 heures, et l'axe des abscisses (index I). Les courbes sont représentées sur le même graphique que l'augmentation du poids de l'utérus (figures 20 et 21). Ici encore, la valeur 1 pour l'index I correspond à l'oestradiol.

Ces courbes peuvent fournir plusieurs renseignements d'ordre qualitatif. La radioactivité dans l'organe cible est d'autant plus importante que le composé présente une activité uterotrophique. Les stéroïdes 11 méthoxylés se différencient des stéroïdes dont ils sont dérivés, oestradiol et éthinyl-oestradiol, par leur vitesse d'accumulation. En effet, pour ces dérivés, la radioactivité augmente pour atteindre un maximum

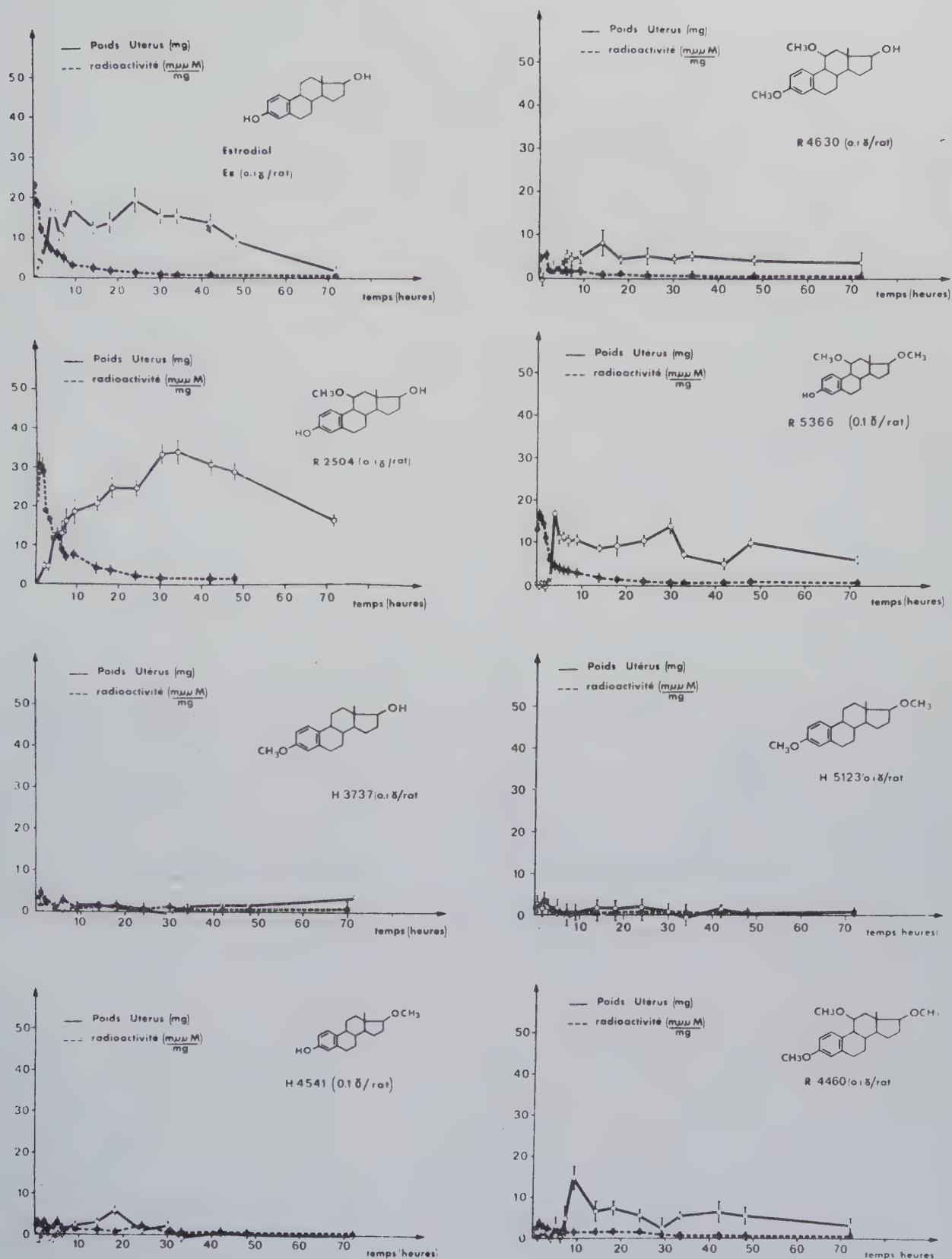


Fig. 20 - ACTIVITE UTEROTROPHIQUE DYNAMIQUE - CAPTATION

Après injection I.V. de tous les dérivés radioactifs de la série oestradiol, à la dose de 0,1 γ par rat, l'augmentation du poids et la quantité de radioactivité par mg sont représentées en fonction du temps. Chaque point est la moyenne de 5 rats.

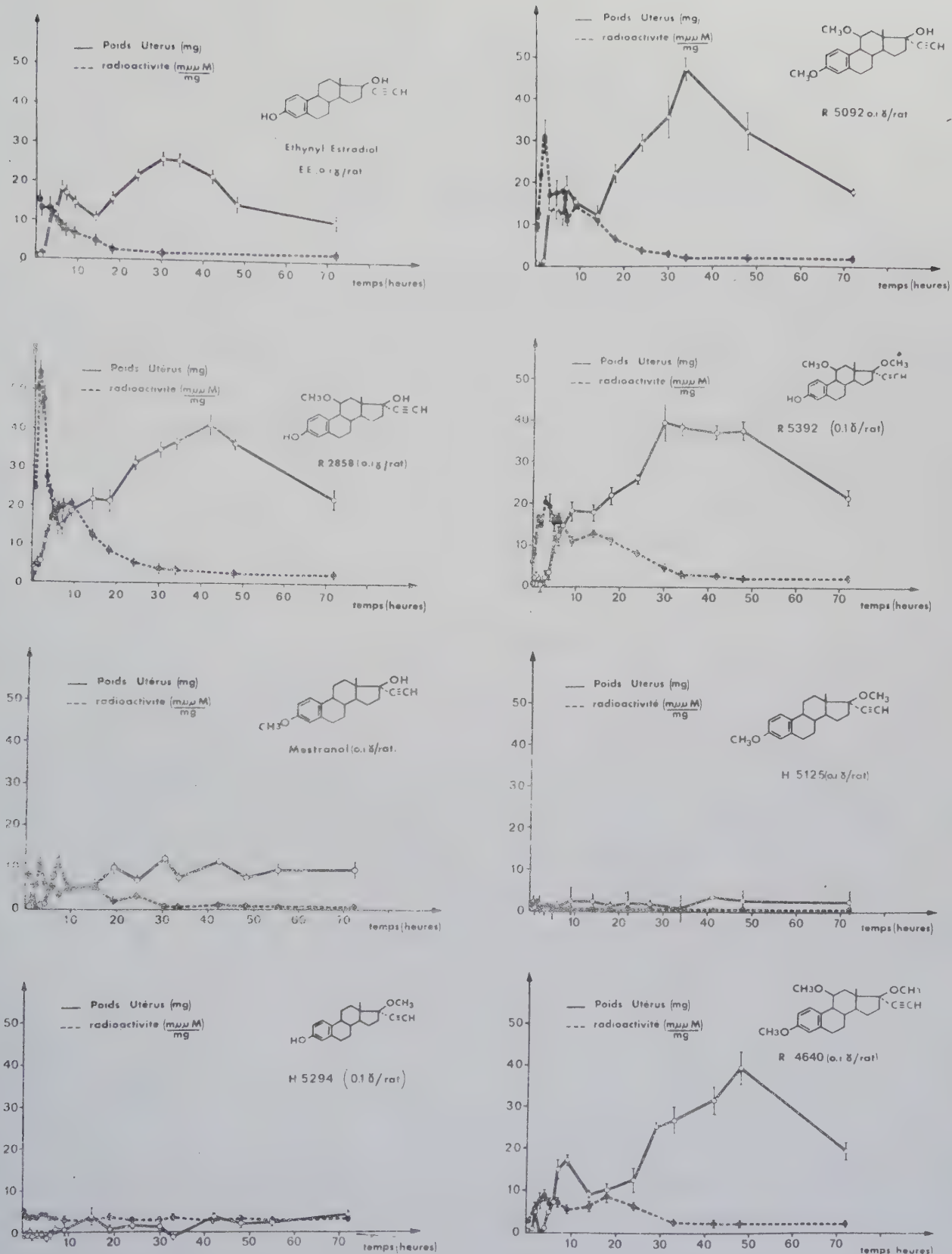


Fig. 21 - ACTIVITE UTEROTROPHIQUE DYNAMIQUE - CAPTATION
Série éthynylœstradiol.

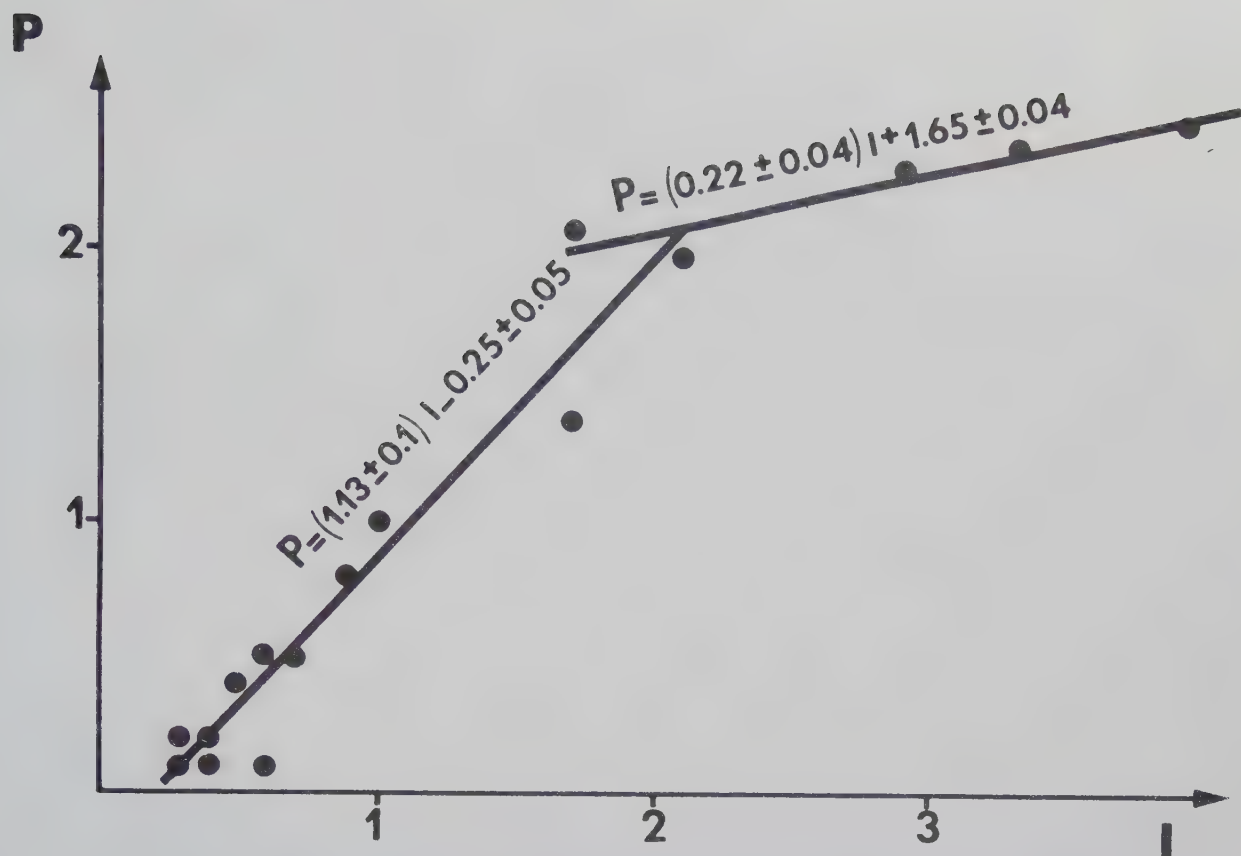
au bout d'une à cinq heures, tandis que l'oestradiol et l'éthynyloestradiol ont une courbe toujours décroissante. Le retard dans le pic de radioactivité se traduit par un retard du maximum de la réponse biologique comme le montre une comparaison des courbes pour le 3,11 MEE, le 11,17 MEE et le 3,11,17 MEE.

Sur un plan quantitatif, la représentation de l'index P en fonction de l'index I (figure 22), met en évidence une bonne corrélation entre activité biologique et captation. Cependant, si, pour les faibles réponses, ces deux index sont proportionnels, au-delà d'une certaine valeur l'index I augmente plus vite que l'index P. Le phénomène peut s'expliquer par l'approche de saturation des sites spécifiques. Une captation de stéroïde beaucoup plus grande devient alors nécessaire pour augmenter la réponse biologique.

Une concentration de la radioactivité par un tissu donné ne permet pas, à elle seule, de conclure au rôle physiologique et hormonal de ce tissu. En effet, l'accumulation de radioactivité peut se faire dans des tissus qui n'ont aucune spécificité hormonale comme les graisses par exemple. L'étude simultanée de la captation de composés actifs et inactifs permet une meilleure définition de la notion de captation tissulaire d'un organe cible. La comparaison entre les différents produits permet de conclure que réponse biologique et captation par un organe cible, sont des phénomènes dépendants et permet de différencier les captations par un organe cible, des accumulations par un organe non cible.

CAPTATION PREFERENTIELLE

L'étude expérimentale de la distribution dans plusieurs tissus de tous les composés mentionnés précédemment est difficilement concevable, en raison du nombre de déterminations qu'elle nécessiterait. Pour cette raison, un choix est fait entre les composés. L'oestradiol étant l'hormone naturelle et le 11 MEE le composé le plus actif, il semble logique de ne conserver que ces deux composés. L'oestradiol a cependant fait l'objet de nombreux travaux cités dans l'introduction de ce chapitre et sa



ŒSTRADIOL	E	3ME	11ME	17ME	3,11ME	11,17ME	3,17ME	3,11,17
P	1	0.2	2.1	0.1	0.4	0.8	0.1	0.5
I	1	0.4	1.7	0.4	0.5	0.9	0.3	0.6
ETHYNYL ŒSTRADIOL	EE	3MEE	11MEE	17MEE	3,11MEE	11,17MEE	3,17MEE	3,11,17
P	1.4	0.5	2.5	0.1	2.3	2.4	0.2	2.0
I	1.7	0.7	3.9	0.6	2.9	3.3	0.3	2.1

Fig. 22 - RELATION ENTRE ACTIVITE UTEROTROPHIQUE (index P) ET CAPTATION (index I)

La forme de la courbe traduit la présence d'un seuil d'activité, puis d'un effet proportionnel et enfin d'une saturation. Les valeurs individuelles pour chaque composé sont indiquées dans le tableau.

distribution est mesurée après injection intraveineuse chez les rats par *Eisenfeld (1967b)*. Les résultats publiés pouvant servir de comparaison, seul le 11 MEE est étudié.

La quantité de stéroïde, accumulée par unité de temps dans un tissu, dépend d'une part de la diffusion du stéroïde, et d'autre part de sa fixation. La diffusion liée aux caractéristiques physicochimiques de la molécule de stéroïde est globalement indépendante de la concentration de cette dernière, alors que la fixation dépend des constantes de vitesse d'association et de dissociation et de la concentration des sites de liaison. Si la constante d'équilibre est faible et le nombre de sites élevés (liaison non spécifique), la fixation peut être assimilée à un partage entre la protéine et le milieu qui la contient. Le pourcentage de fixation est indépendant de la dose injectée. Par contre, dans le cas d'une liaison spécifique le pourcentage de fixation est inversement proportionnel à la dose.

Ces remarques conduisent donc à étudier la distribution pour différentes doses injectées pour mettre en évidence les récepteurs. Les courbes d'accumulation sont complexes en raison de l'intervention de nombreux paramètres, aussi une représentation permettant d'analyser simplement les résultats est nécessaire. En absence de liaison spécifique dans un tissu, la quantité de stéroïde accumulée par unité de temps est proportionnelle à la dose injectée. Si les quantités accumulées sont exprimées en pourcentage de la dose injectée par g de tissu ou ml de plasma par unité de temps, la valeur obtenue reste constante. Pour calculer cette valeur, il suffit d'intégrer la courbe d'accumulation. Comme le produit est injecté une seule fois, il disparaît complètement au bout d'un certain temps et les deux limites d'intégration doivent être considérées en fonction de cette observation. Elles sont fixées à 0 et 72 heures. L'intégration est faite par ordinateur par la méthode des trapèzes. Si, une liaison spécifique est présente, le pourcentage de la dose accumulée par g ou par ml diminue en fonction de la saturation des sites de liaison spécifique. Ils sont saturés lorsqu'une même valeur est obtenue pour deux doses successives.

Les résultats obtenus avec le 11 MEE sont représentés sur la figure 23. La dose injectée varie de 0,04 à 3,1 μ g.

Dans le plasma, l'accumulation de radioactivité par ml et par heure est indépendante de la dose injectée montrant ainsi l'absence de protéine de transport plasmatique pour ce stéroïde. De même, les valeurs obtenues pour le foie et le cerveau sont indépendantes de la dose. Il est intéressant de noter que la quantité de stéroïde présente dans le foie est dix fois supérieure. Dans l'hypothalamus, cette valeur décroît en fonction de la dose, pour devenir identique à la valeur unique obtenue pour toutes les doses dans le cerveau. Ce résultat met en évidence la présence de sites spécifiques dans l'hypothalamus pour le 11 MEE, résultat similaire à celui trouvé dans le cas de l'oestradiol. (*Kahwanago, Heinrichs et Hermann (1969, 1970), Kato (1970)*). L'hypophyse concentre beaucoup plus de radioactivité, mais il semble que les sites spécifiques soient plus rapidement saturables, donc plus faibles en nombre. En effet, aux trois plus fortes doses, le pourcentage de fixation est identique et reste élevé, montrant ainsi une liaison non spécifique importante dans cet organe. Un résultat qualitativement similaire est obtenu pour l'ovaire. Enfin, l'utérus à la plus faible dose concentre la radioactivité 100 fois plus que le plasma ou le cerveau. La différence très marquée entre chaque dose, implique une valeur élevée de la constante d'association de ces sites spécifiques utérins. Pour la plus forte dose, le pourcentage de fixation est de l'ordre de celui obtenu dans les organes non cibles.

Si les premières expériences permettent de mettre en évidence une corrélation entre activité utérotrrophique et captation, cette expérience de captation préférentielle montre comment à partir de l'étude de la distribution, il est possible de déceler les organes où un stéroïde interagit sélectivement. Les résultats déduits de cette expérience doivent être confirmés par la mise en évidence directe d'une fixation spécifique du 11 MEE dans les organes cibles ainsi que de l'absence de cette fixation spécifique dans le plasma.

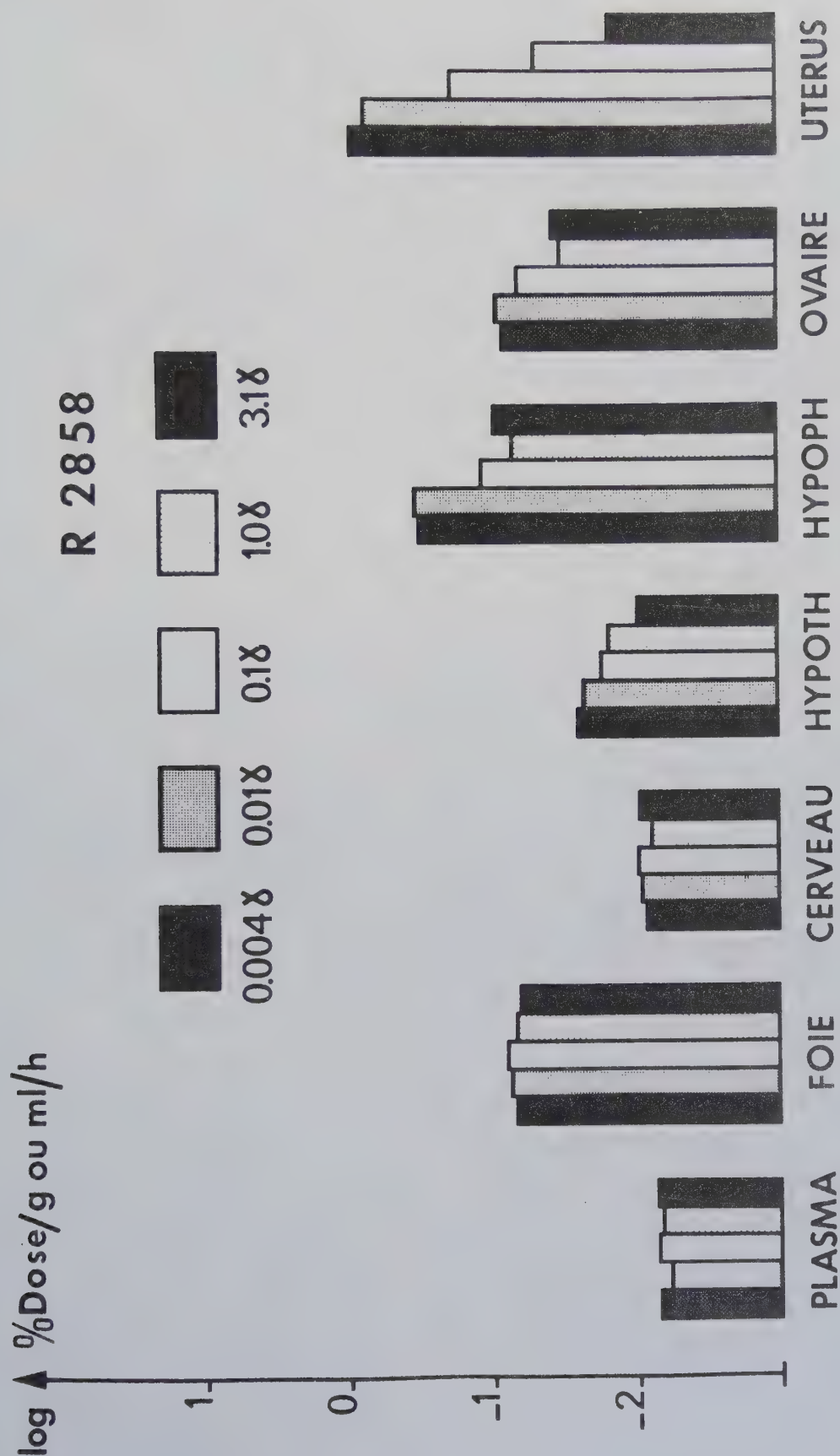


Fig. 23 - CAPTATION PREFERENTIELLE

Cinq doses sont étudiées pour chaque prélèvement et représentées sous forme de colonnes. La hauteur de chaque colonne représente le pourcentage de la dose de stéroïde accumulée par unité de temps, chez la rate impubère âgée de 19-21 jours. Cette valeur est calculée en intégrant la courbe de captation en fonction du temps.

3^{EME} CHAPITRE

METABOLISME

La présence de radioactivité dans l'organe cible ne signifie pas nécessairement que cette radioactivité corresponde à celle du produit initialement injecté. Par exemple, *Jensen et coll. (1966b)*, montrent qu'après injection de mestranol, seul l'éthynyloestradiol est retenu dans l'utérus. Le sulfate d'oestradiol se concentre sous forme d'oestradiol *Nunez (1968)*. Par contre, le 17 α méthyloestradiol, le 17 α éthynyloestradiol ou l'hexoestrol sont présents dans l'utérus sans subir de transformation chimique *Jensen (1964)*. Pour vérifier la nature du stéroïde capté, des études de métabolisme sont faites. D'après les résultats biologiques du premier chapitre, les dérivés éthynylés possèdent l'activité la plus importante et, pour cette raison, les études métaboliques sont limitées à cette série. De plus, l'oestradiol, produit de référence, est également étudié. Le métabolisme de chaque composé est déterminé en fonction du temps, à la fois dans le plasma et dans l'utérus.

MATERIEL ET METHODES

0,1 μ g de stéroïde radioactif (15 μ C) sont injectés par voie intraveineuse à des rates impubères âgées de 19-21 jours. Les animaux sont décapités 15, 30, 60, 90, 120 et 180 minutes après l'injection. Le sang est recueilli dans des tubes héparinisés, centrifugé, et pour chaque point le plasma de 5 animaux est réuni. Un aliquot de 1 ml sert à mesurer la radioactivité totale, tandis que 2 ml sont extraits 2 fois par 10 ml de chloroforme après addition de 20 μ g de produit froid. Les utérus sont rapidement prélevés et homogénéisés à 0°C dans 0,5 ml de sérum physiologique. Comme pour le plasma, les broyats de 5 utérus sont réunis pour chaque point expérimental et le volume amené à 3 ml. 1 ml est prélevé pour déterminer la radioactivité totale, les stéroïdes contenus dans les 2 ml restants sont extraits dans les mêmes conditions que le plasma. Les extraits plasmatiques et tissulaires sont chromatographiés sur couche mince dans le système cyclohexane/acétone, 7/3, ou benzène/acétate d'éthyle, 7/3. Une plaque témoin faite simultanément sert pour repérer l'emplacement du composé. Les plaques sont ensuite grattées, éluées par le méthanol et chaque fraction est comptée par scintillation liquide. Les résultats, corrigés par le facteur de récupération, sont exprimés en pourcentage de la dose par ml de plasma ou par g de tissu.

RESULTATS

La figure 24 représente les courbes obtenues pour l'oestradiol, pour l'éthynyloestradiol et ses dérivés méthoxylés et méthylés.

AU NIVEAU DE L'UTERUS

Dans le cas de l'oestradiol, de l'éthynyloestradiol ou du dérivé 11 MEE, la radioactivité totale est essentiellement celle du composé initial non métabolisé. La courbe de radioactivité, en fonction du temps, présente les caractéristiques

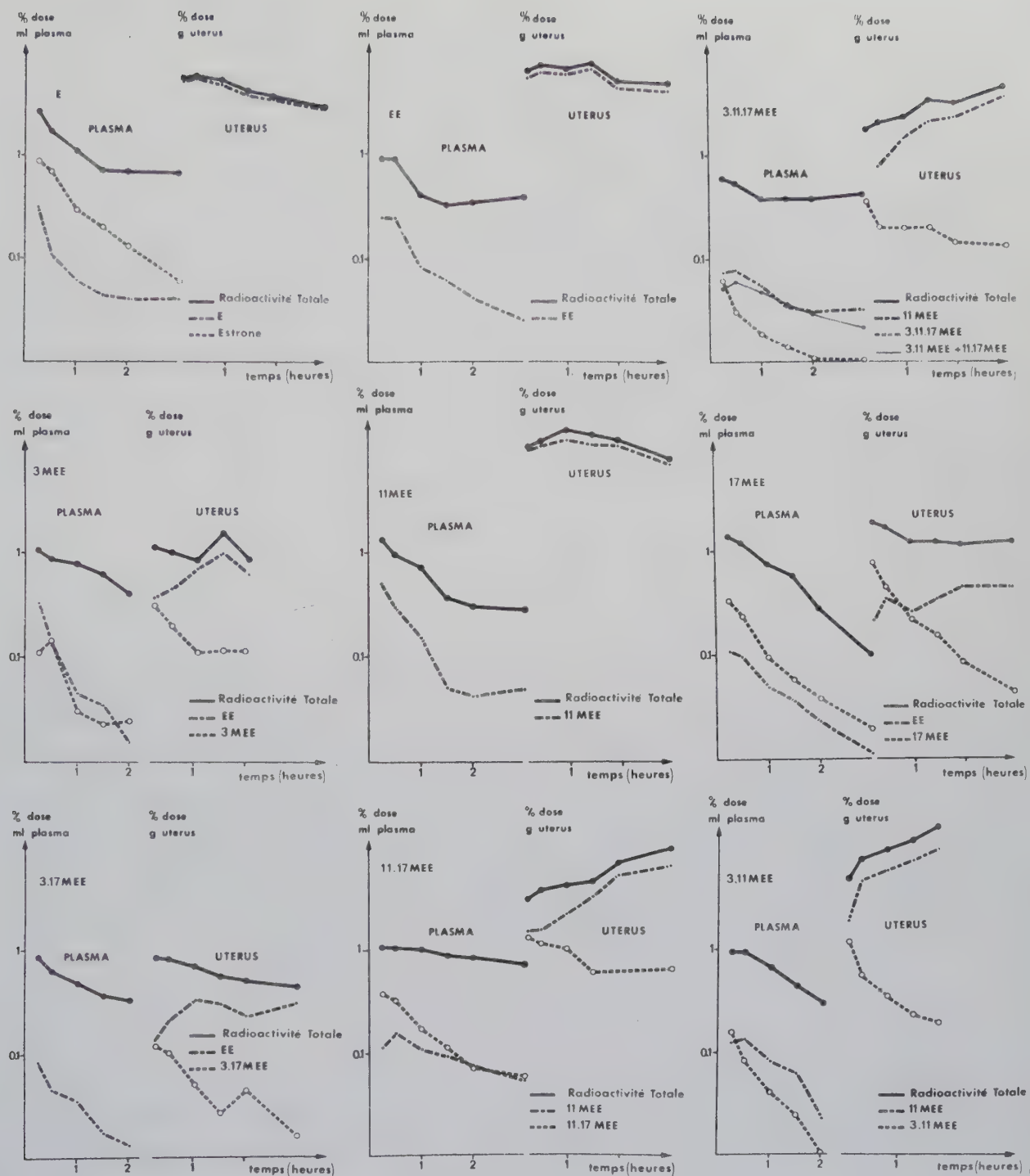


Fig. 24 - METABOLISME DANS LE PLASMA ET L'UTÉRUS, DE L'OESTRADIOL L'ETHYNYLOESTRADIOL ET DE SES DERIVES

La radioactivité totale, le produit injecté et les métabolites sont exprimés en pourcentage de la dose par ml de plasma ou par gramme d'utérus et représentés en fonction du temps sur des échelles semi-logarithmiques. Les métabolites sont séparés par C.C.M., identifiés avec le produit de référence et les résultats corrigés en fonction de la récupération. A l'exception de l'oestrone, seuls les métabolites correspondant à EE ou à ses dérivés méthoxylés et méthylés sont recherchés.

d'une rétention plutôt que d'une disparition.

Pour tous les autres dérivés de l'éthynyloestradiol, le schéma est totalement différent. Le composé initialement injecté se retrouve partiellement métabolisé dans l'utérus, la courbe de la radioactivité du produit non métabolisé traduit la disparition rapide de ce composé. Le principal métabolite retenu dans l'utérus est soit l'EE pour les composés non méthoxylés en 11, soit le 11 MEE pour les composés méthoxylés en 11. Cette observation met en évidence la différence entre le méthoxyle en 11 et les méthyles en 3 ou 17. La molécule méthoxylée en 11 a une structure chimique très stable, alors que l'éther méthylque en 3 ou 17 peut enzymatiquement se cliver.

Le 11 MEE est le composé pour lequel le pourcentage de la dose par gramme de tissu est le plus élevé. Sa courbe de radioactivité présente son maximum au bout d'une heure. Si ce dérivé est, de plus, méthylé en 3 et/ou en 17, la courbe de radioactivité de son métabolite, le 11 MEE, est croissante, mais ne présente plus de maximum au cours des 3 premières heures, expliquant l'action retard observée pour ces stéroïdes dans l'étude biologique précédente. La courbe de radioactivité du 11,17 MEE en fonction du temps présente les caractéristiques d'une rétention plutôt que d'une disparition. Le pourcentage de 11 MEE dans l'utérus est du même ordre, si le produit est injecté directement ou s'il provient de la transformation métabolique d'un de ses éthers. A l'inverse, le pourcentage d'EE dans l'utérus, comparable à celui du 11 MEE si l'EE est injecté, devient beaucoup plus faible si l'EE provient d'une transformation métabolique. Ceci explique la faible activité des dérivés 3 ou/et 17 méthylés.

AU NIVEAU DU PLASMA

La radioactivité totale n'est plus essentiellement celle du produit injecté. La nature des métabolites plasmatiques n'a pas été systématiquement étudiée ; seuls sont identifiés l'EE, les dérivés méthoxylés et méthylés et

l'oestrone. On remarque simplement que dans la série EE, les métabolites identifiés se retrouvent aussi bien dans le plasma que dans l'utérus. L'oestrone, ne se retrouve que dans le plasma et non dans l'utérus.

Pour les composés peu actifs, c'est-à-dire le 3 MEE, le 17 MEE et le 3,17 MEE, le pourcentage de radioactivité totale est au même niveau dans le plasma et dans l'utérus, tandis que, dans le cas des stéroïdes actifs, le pourcentage de radioactivité totale dans le plasma est plus de 10 fois inférieur à celui de l'utérus. Cette concentration de l'oestrogène par l'utérus permet de confirmer les résultats présentés dans les chapitres précédents pour le 11 MEE.

D'après ces études, l'activité biologique de tous les dérivés étudiés dans la série EE est due à leur transformation métabolique, soit en EE, soit en 11 MEE.

4EME CHAPITRE

SITES DE FIXATION DES OESTROGENES

Toutes les expériences précédemment décrites permettent donc de suivre le destin du stéroïde avant qu'il ne se fixe dans l'utérus.

L'interaction avec une protéine d'origine cytoplasmique a lieu après l'injection et la distribution tissulaire, et avant la réponse biologique. Par sa spécificité, cette interaction semble intervenir comme un système tout ou rien, l'absence ou la présence d'une fixation conduisant ou non à une réponse biologique spécifique de l'hormone. Cependant, d'autres interactions peuvent moduler cette réponse, c'est-à-dire agir sur son intensité, et en particulier les interactions plasmatiques. Pour cette raison, ces deux types d'interactions sont analysés.

MATERIEL ET METHODES

PROTEINES

Les protéines tissulaires solubles proviennent d'utérus, prélevés sur des rates Wistar impubères âgées de 21 jours, et homogénéisés à l'aide d'un Potter verre-verre dans une solution de sucrose 0,88 M, pH = 7,0 ou dans un tampon Tris 0,01 M, EDTA 0,0015 M, pH = 7,4, puis centrifugés une heure à 105000 g dans une ultracentrifugeuse (Spinco) à 4°C. Les protéines plasmatiques des mêmes animaux sont obtenues à partir du sang recueilli sur héparine. Le plasma après centrifugation est dilué au 1/20. Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry, Roselbrough, Farr et Randall (1951).

MESURE DES INTERACTIONS STEROIDES-PROTEINES

Dialyse à l'équilibre

Une solution éthanolique, contenant 0,1 nM de stéroïde radioactif et des quantités croissantes de 0,2 à 1000 nM de stéroïde froid, est évaporée dans des flacons pour scintillation liquide. Après évaporation à sec, le stéroïde restant au fond du flacon est mis en solution par addition de 15 ml de tampon phosphate. 1 ml de la solution protéique (1,5 mg de protéine/ml) contenu dans un sac de dialyse (Nojax) est placé dans cette solution externe. La dialyse s'effectue à 4°C. L'équilibre, activé par agitation magnétique, est atteint au bout de 20 heures. 0,2 ml de la solution sont prélevés trois fois à l'extérieur et à l'intérieur du sac, et la radioactivité mesurée par scintillation liquide. Les résultats sont représentés et les paramètres calculés par la méthode du "graphique proportionnel" déjà décrite, et qui consiste à représenter le logarithme de la fraction libre u , ou liée b , en fonction du logarithme de la concentration totale T du stéroïde.

Dans le cas où une liaison non spécifique élevée peut masquer la liaison spécifique il est nécessaire de savoir si cette dernière existe ou en d'autres termes si le composé est un compétiteur. La réponse à cette question ne nécessitant pas

l'évaluation de la constante d'association du compétiteur, la méthode de compétition décrite aux chapitres 2 et 3 a été simplifiée. Le schéma expérimental suivant est utilisé. Un ligand possédant un bon rapport spécifique/non spécifique est choisi. A une quantité très faible de ligand radioactif (0,15 nM) qui ne sature pas les sites de liaison spécifique est ajoutée 3,33, 33,3 ou 333 nM de ligand ou de compétiteur. Le pourcentage de diminution de la radioactivité liée, obtenu après addition soit du ligand froid, soit du compétiteur, sert à évaluer l'effet du compétiteur. Un stéroïde non compétiteur ne change pas la liaison, un stéroïde faiblement compétiteur n'a d'effet qu'à ses plus hautes concentrations, alors que pour un stéroïde fortement compétiteur, le pourcentage de diminution de la radioactivité liée est égale, sinon supérieur à celui enregistré après addition d'une quantité identique de ligand froid.

Ultracentrifugation

La technique d'ultracentrifugation en gradient de sucrose est utilisée. 1 ml de cytosol obtenu à partir d'utérus homogénéisés dans un tampon Tris 0,01 M, EDTA 0,0015 M, pH = 7,4 (contenant 10 mg de protéines), ou de plasma (dilué au 1/10), est incubé avec le stéroïde radioactif, puis déposé sur un gradient linéaire de 5-20 % de sucrose dans le même tampon et centrifugé à 40000 tours par minute dans le rotor SW41 de la Spinco L65 pendant 18 heures à 4°C. Enfin des fractions de 4 gouttes sont collectées par le bas du tube et la radioactivité de chaque fraction mesurée par scintillation liquide. Les résultats sont toujours exprimés en quantité de stéroïde radioactif présent dans chaque fraction.

Cette technique est également utilisée dans des expériences *in vivo*. Dans ces expériences, les stéroïdes radioactifs sont injectés par voie intraveineuse à des rates impubères, sacrifiées une heure après l'injection. Les utérus sont rapidement prélevés pour préparer le cytosol qui est déposé directement sur le gradient.

Remarque : Les résultats obtenus en dialyse sont identiques lorsque l'utérus est homogénéisé soit dans le sucrose 0,88 M soit dans le tampon Tris EDTA.

RESULTATS

LIAISON SPECIFIQUE DANS L'UTERUS

Une forme en S de la courbe de liaison obtenue par dialyse est caractéristique de la présence de sites de liaison spécifique et non spécifique. Comme le montre la figure 25, une telle forme de courbe de liaison est observée nettement pour l'oestradiol et l'éthynyloestradiol et leurs deux dérivés 11 méthoxylés. Cette forme se retrouve pour le dérivé 11,17 ME, mais elle est beaucoup moins prononcée. De même, il est possible que le 11,17 MEE soit lié de façon spécifique ; mais cette liaison doit être faible par rapport à la liaison non spécifique. Les mesures sont trop imprécises pour caractériser avec certitude cette liaison spécifique, car ce composé est peu soluble. Tous les autres composés donnent une droite caractéristique d'une liaison non spécifique. Dans la plupart des cas, cette liaison non spécifique est très importante et il est difficile, pour cette raison, de conclure à l'absence de liaison spécifique.

Les expériences de compétition permettent l'étude plus précise de la liaison et de l'affinité relative de ces stéroïdes pour les sites de liaison spécifique. Le 11 MEE est choisi comme produit de référence, car sa liaison non spécifique est beaucoup plus faible que celle de l'oestradiol. Les résultats de ces études de compétition sont indiqués dans le tableau 2. Les valeurs correspondent au pourcentage de diminution de la fraction liée provoquée par l'addition de trois concentrations de compétiteur. A la plus faible concentration (3 nM), seuls l'E, EE, 11 ME et 11 MEE diminuent d'une façon appréciable la quantité de 11 MEE radioactif fixé spécifiquement, confirmant les résultats précédents. A la concentration de 33 nM, un effet comparable apparaît pour tous les dérivés 17 méthylés. Cet effet n'est atteint qu'à la concentration de 333 nM pour les dérivés 3 méthylés. Enfin, il n'y a plus aucune compétition si les positions 3 et 17 sont méthylées. Le radical 11 méthoxylé influence donc peu la fixation. Par contre, la méthylation en position 17 réduit 10 fois l'affinité du stéroïde pour le récepteur et, en position 3, la réduit 100 fois. L'affinité

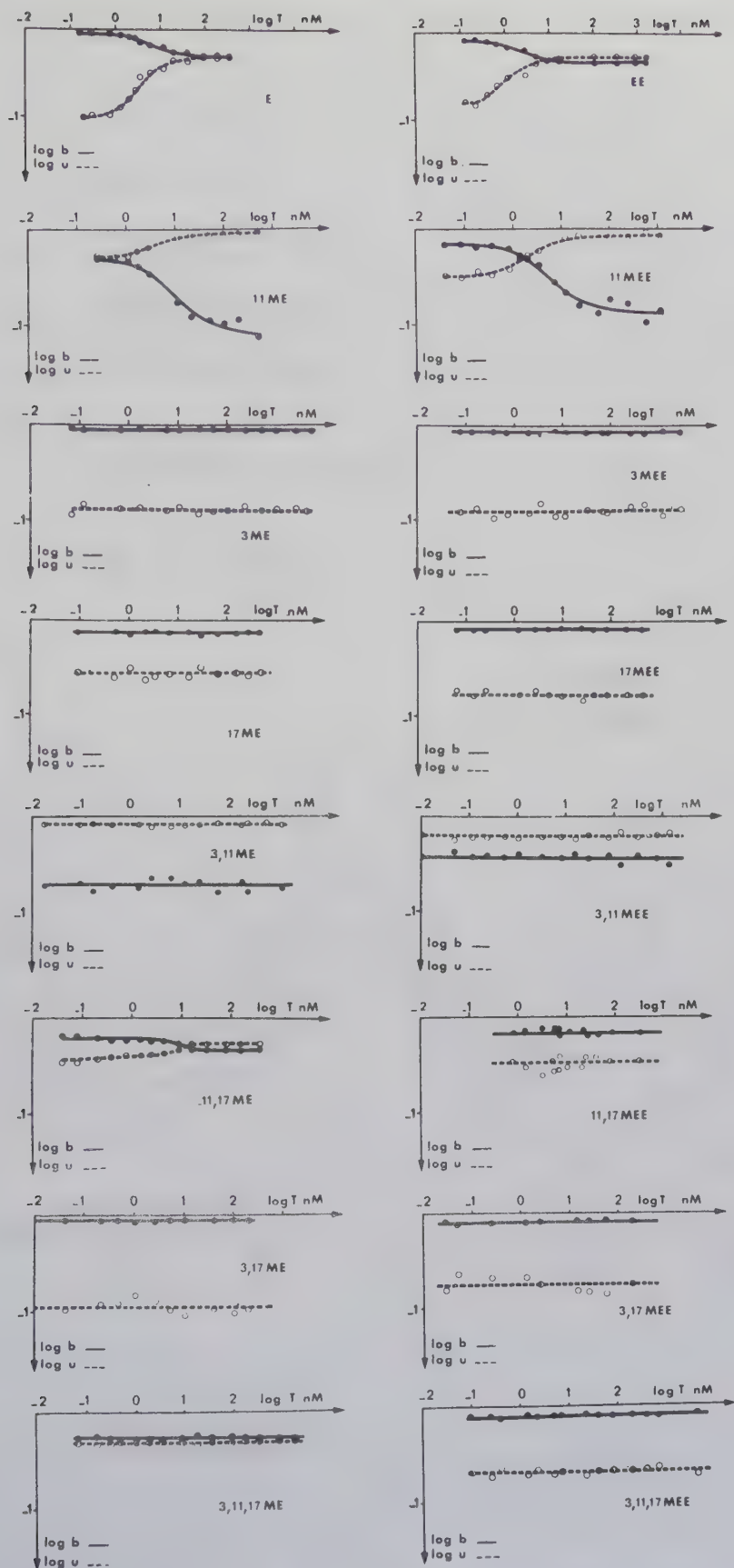


Fig. 25 - REPRESENTATION PAR LE GRAPHIQUE PROPORTIONNEL DE LA LIAISON DE TOUS LES DERIVES AUX PROTEINES CONTENUES DANS LE CYTOSOL UTERIN DES RATES IMPUBERES

Par dialyse à l'équilibre à 4°C, dans cette préparation contenant 1,5 mg de protéines/ml, seuls E, EE, 11ME et 11MEE et plus faiblement 11,17ME se lient spécifiquement.

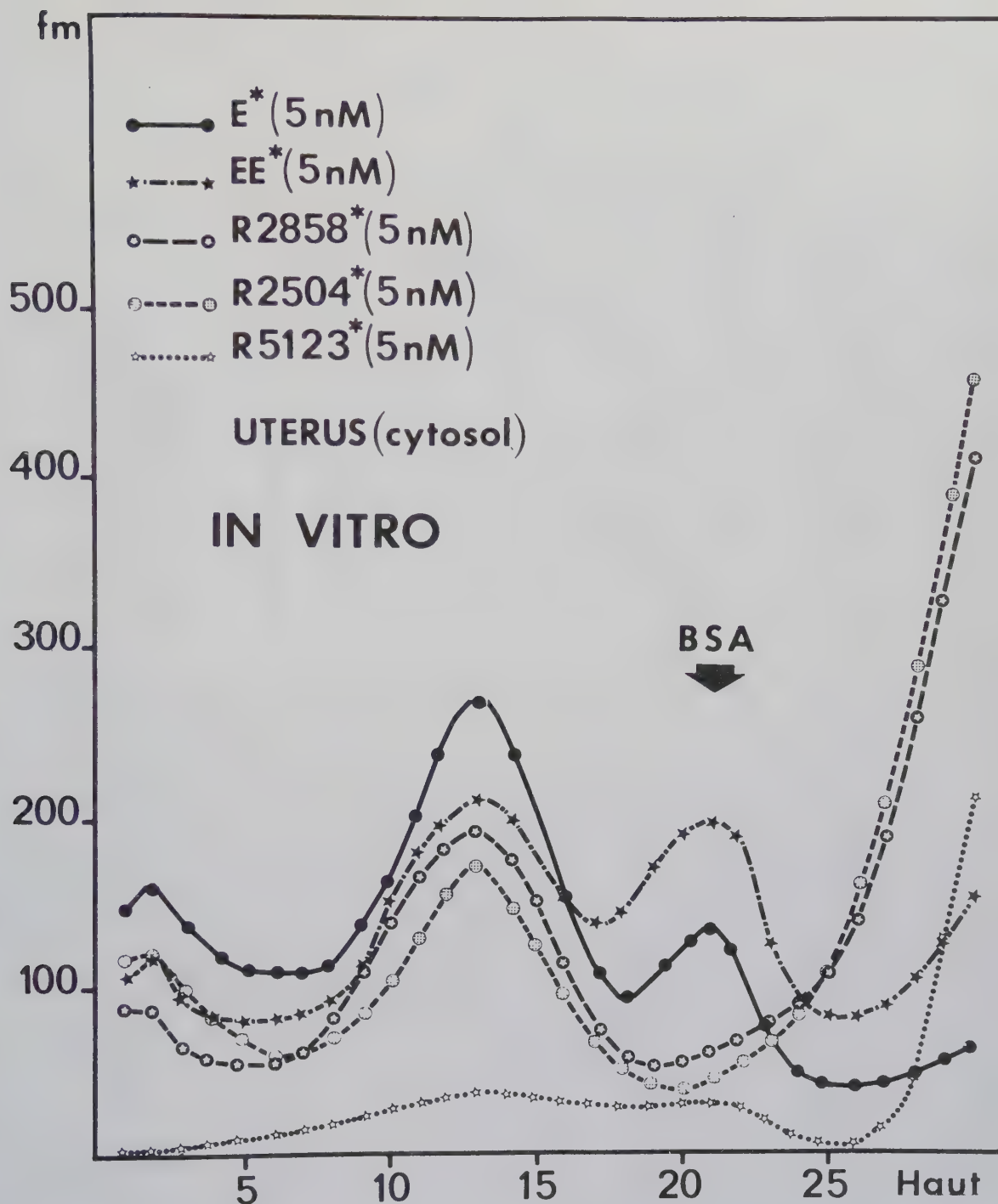


Fig. 26 - LIAISON DE E, EE, 11ME, 11MEE ET 3,17ME DANS LE CYTOSOL DE L'UTERUS DE RAT

1 ml de cytosol contenant 10 mg de protéines dans un tampon Tris 0,01M, EDTA, 0,015M pH = 7,4 est incubé avec 5 nM de E, EE, 11ME, 11MEE et 3,17ME (40C/mM) et déposé sur un gradient linéaire de 5-20 % de sucrose dans 11 ml du même tampon et centrifugé à 40000 tours par minute dans le rotor SW41 de la Spinco L 65 pendant 18 heures à 4°C.

L'ordonnée indique la quantité de chaque stéroïde (exprimée en 10⁻¹⁵ mole) présente dans chaque fraction de 4 gouttes collectée par le bas du tube.

E et EE sont fixés dans la région 8S et 4S, 11ME et 11MEE ne sont fixés que dans la région 8S, 3,17ME n'est pas fixé.

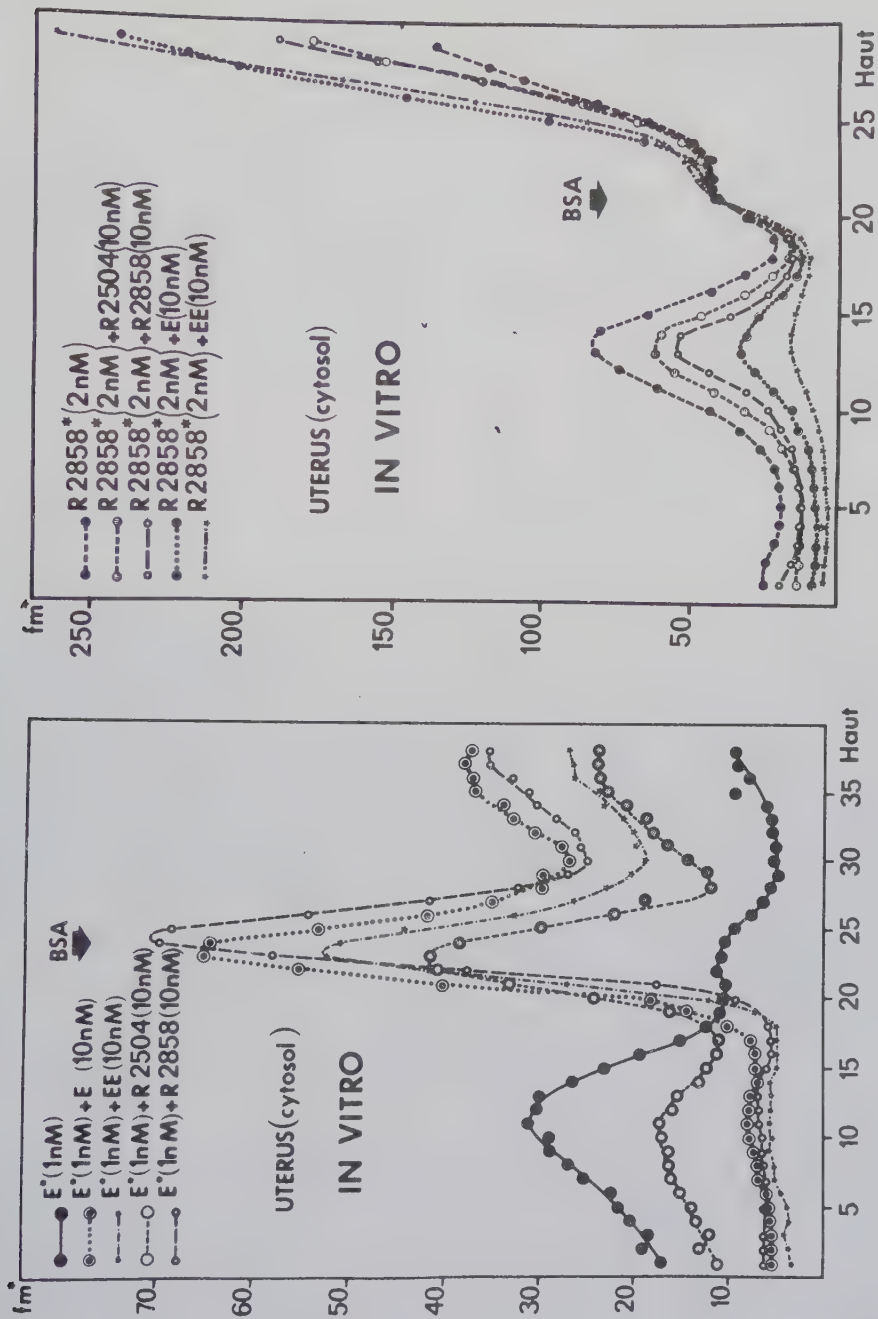


Fig. 27 - ETUDE DE LA COMPETITION DE E, EE, 11ME ET 11MEE PAR ULTRACENTRIFUGATION
A 1nM d'oestradiol ou 2nM de 11MEE radioactif sont ajoutés 10nM de chacun des 4 stéroïdes expérimentaux correspondent à la quantité de stéroïde radioactif présente dans la fraction.

a - Compétition sur l'oestradiol
L'oestradiol est déplacé de la région 8S par la quantité de 11MEE radioactif présente dans la région 8S diminue et se retrouve sous la forme de la radioactivité dans la région 8S est proportionnelle à l'affinité de la région 8S pour le récepteur.

b - Compétition sur le 11MEE
La quantité de 11MEE radioactif présente dans la région 8S diminue et se retrouve sous la forme de la radioactivité dans la région 8S est proportionnelle à l'affinité de la région 8S pour le récepteur.

ETUDES DE COMPETITION (CYTOSOL)

	3 nM	33 nM	333 nM
E	44	59	64
11 ME	36	65	61
3 ME	6	13	48
17 ME	5	42	53
3,11 ME	0	0	11
11,17 ME	9	39	56
3,17 ME	0	00	0
3,11,17 ME	0	0	1
EE	50	62	65
11 MEE	38	59	65
3 MEE	5	12	31
17 MEE	9	36	54
3,11 MEE	0	13	41
11,17 MEE	12	40	77
3,17 MEE	0	0	0
3,11,17 MEE	0	2	4

TABLEAU 2

Les protéines cytosolubles (1,5 mg/ml) de rates impubères sont incubées avec 0,15 nM de 11 MEE radioactif (40C/mM), quantité qui ne sature pas les sites de liaison spécifique. La liaison est mesurée par dialyse à l'équilibre à 4°C. Le 11 MEE est choisi comme produit de référence, car la liaison non spécifique est faible. Les valeurs dans le tableau indiquent le pourcentage de diminution de la fraction liée, obtenu après addition à cette quantité de 11 MEE radioactif, de 3,33, 33,3 ou 333 nM de ligand ou de compétiteur.

L'effet compétiteur est le plus important, lorsque les composés ne sont pas méthoxylés, diminue progressivement s'ils sont substitués en 11 puis en 17, puis en 3 pour disparaître lorsque les positions 3 et 17 sont méthylées.

de ces composés pour le site de fixation de la protéine met en évidence le rôle primordial joué par le noyau phénolique.

Les quatre composés E, EE, 11 ME et 11 MEE possédant la plus forte affinité *in vitro*, des études d'ultracentrifugation en gradient de sucrose sont réalisées.

A la concentration de 5 nM, ces quatre stéroïdes sont fixés sur une protéine de coefficient de sédimentation "8 S" (figure 26), alors que dans la région "4-5 S", seuls E et EE le sont. Le 3,17 ME, composé inactif, n'est fixé ni dans l'une ni dans l'autre région. Des études de compétition montrent qu'à la concentration de 1 nM l'oestradiol présente un pic uniquement dans la région 8 S. Il est déplacé de son site de fixation par 10 nM de chacun des 4 composés et se retrouve dans la région "4 S" (figure 27a). Par contre, 2 nM de 11 MEE sont déplacés par 10 nM de chacun de ces 4 composés vers la zone libre et la fixation dans la région "4 S" est pratiquement négligeable (figure 27b). Ces résultats confirment l'absence de fixation du dérivé 11 MEE dans la région "4 S" observée sur la figure 26 et démontrent un point essentiel dans le mécanisme d'action des oestrogènes : la liaison sur les protéines de la région "4-5 S" ne semble pas nécessaire pour l'activité utéro-trophique. Cependant, cette activité n'est pas proportionnelle à la fixation spécifique *in vitro* du stéroïde dans la région "8 S", car les deux dérivés 11 méthoxylés, plus actifs que E et EE, présentent les pics d'amplitude les plus faibles. Elle n'est pas non plus proportionnelle à l'affinité pour le récepteur mesurée par compétition en dialyse, ni aux constantes intrinsèques d'association estimées par la technique de dialyse à l'équilibre. (Pour des raisons pratiques, nombre de rats, stabilité du cytosol, les produits sont comparés deux par deux (tableau 3)).

En effet, les valeurs de la constante intrinsèque d'association sont, par ordre décroissant, $EE > E > 11\text{ MEE} > 11\text{ ME}$, confirmant les résultats obtenus par compétition aussi bien après dialyse (pourcentage de diminution de radioactivité fixée) (tableau 2) qu'après ultracentrifugation (diminution de l'amplitude du pic de radioactivité dans la région "8 S" (figure 27).

Par contre, dans les expériences *in vivo*, où les animaux sont injectés une heure avant le sacrifice, avec 0,2 nM/rat de E, EE, 11 ME et 11 MEE, 3,17 ME radioactifs, les résultats

PARAMETRES DE LA LIAISON DE E, EE, 11 ME ET 11 MEE
AUX PROTEINES CYTOSOLUBLES DE L'UTERUS DE RATE IMPUBERE

	E	EE	11ME	11MEE
$K_S 10^{-9} M^{-1}$	$4,5 \pm 2,0$	$7,1 \pm 1,4$		
$N_S 10^{-9} M$	$1,0 \pm 0,4$	$0,7 \pm 0,1$		
$K_{NS} N_{NS}$	$0,5 \pm 0,25$	$0,9 \pm 0,1$		
$K_S 10^{-9} M^{-1}$			$0,7 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,2$
$N_S 10^{-9} M$			$1,5 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,3$
$K_{NS} N_{NS}$			$0,12 \pm 0,06$	$0,13 \pm 0,06$
$K_S 10^{-9} M^{-1}$	$6,6 \pm 1,3$			$2,2 \pm 0,2$
$N_S 10^{-9} M$	$0,8 \pm 0,1$			$0,8 \pm 0,1$
$K_{NS} N_{NS}$	$1,2 \pm 0,1$			$0,14 \pm 0,01$

TABLEAU 3

Les paramètres de la liaison des quatre dérivés sont mesurés par dialyse à l'équilibre à 4°C. les utérus de rates Wistar de 21 jours sont homogénéisés dans une solution de sucrose 0,88 M, pH 7,0 et puis centrifugés à 4°C, 1 heure à 105000g. Le cytosol ainsi préparé est utilisé à la concentration de 1,5 mg/ml. Les composés sont étudiés 2 par 2.

de fixation sont différents. La comparaison des gradients obtenus *in vivo* (figure 28a) et *in vitro* (figure 28b) démontre que l'amplitude des pics correspondant au récepteur "8 S" n'est pas dans le même ordre pour les dérivés 11 méthoxylés. Dans les expériences *in vitro*, la liaison sur le récepteur "8 S" est proportionnelle à l'affinité, alors que dans les expériences *in vivo*, elle est proportionnelle à la captation et donc à l'activité biologique. En effet, les courbes de captation de l'utérus pour la dose de 0,2 nM/rat pendant une période de temps comprise entre 2 minutes et 6 heures (figure 29), prouvent que la captation dans l'utérus est en relation directe avec la fixation sur le récepteur "8 S" observée dans l'expérience *in vivo*. De plus, à dose physiologique, le récepteur "4-5 S" n'intervient pas dans la fixation. Le 3,17 ME n'est ni fixé sur le gradient, ni capté dans l'utérus.

LIAISON SPECIFIQUE DANS LE PLASMA

Les courbes de liaison aux protéines plasmatiques, obtenues par dialyse à l'équilibre sont représentées sur la figure 30. Seule l'hormone endogène, l'oestradiol, se lie spécifiquement dans le plasma. Pour tous les autres stéroïdes, on observe une droite caractéristique d'une liaison non spécifique. Ce résultat est différent de celui obtenu pour l'utérus. En effet, par la même technique, la liaison spécifique de l'E, EE, 11 ME et 11 MEE est facilement mise en évidence.

Comme précédemment, la liaison de ces 4 composés est étudiée dans le plasma par ultracentrifugation en gradient de sucrose (figure 31). Le 11 MEE et le 11 ME se retrouvent sur le gradient sous forme libre essentiellement, confirmant l'absence de liaison spécifique pour ces deux dérivés, déjà observée par dialyse. Par contre, l'oestradiol ainsi que l'éthynyl-oestradiol, sont fixés sur un ensemble de protéines dont le coefficient de sédimentation (4,6S) coïncide avec celui de l'albumine utilisée comme standard.

La droite obtenue en dialyse pour l'éthynyl-oestradiol traduit mal ce dernier résultat. Mais une liaison spécifique pour l'EE peut être masquée par sa liaison non spécifique, car la courbe en S peu prononcée de l'oestradiol indique que le

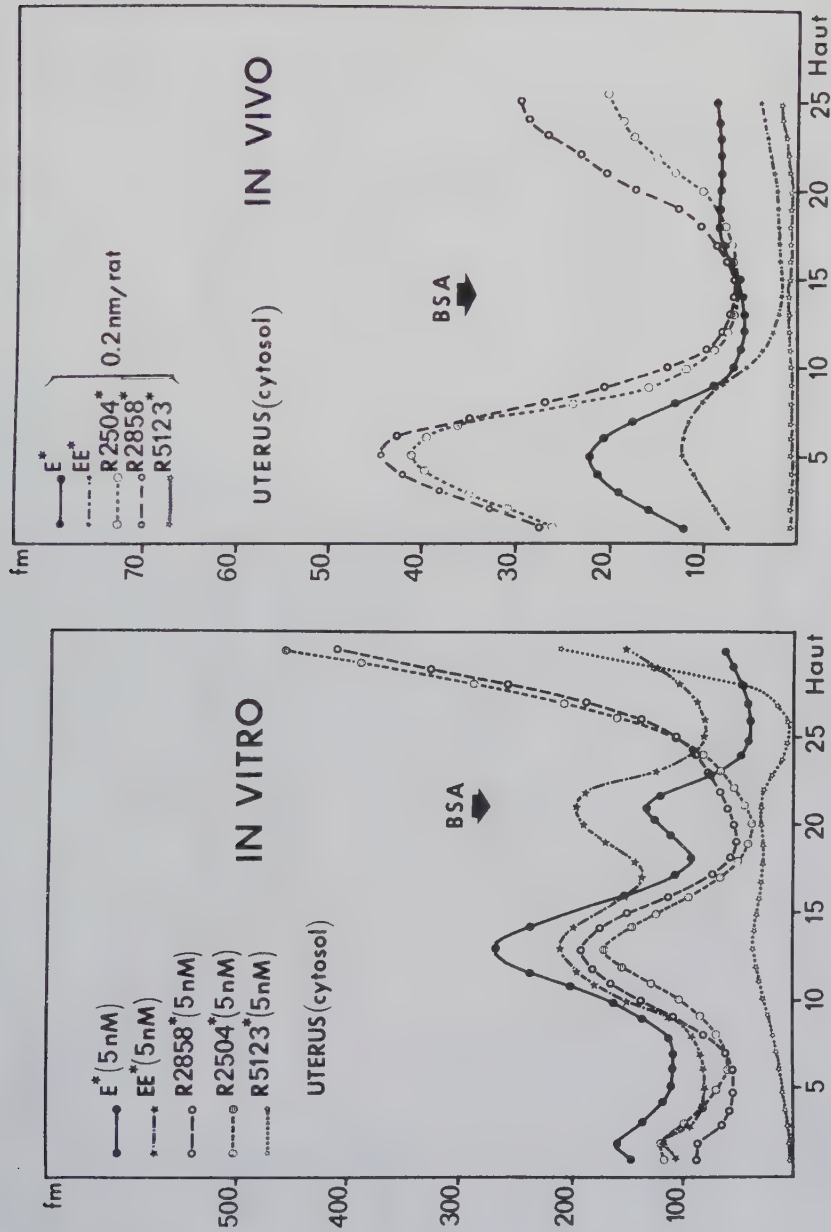


Fig. 28 - COMPARAISON ENTRE LIAISON IN VITRO ET IN VIVO
Les quatre produits E, EE, 11ME, 11MEE, sont représentés.

a - Expériences in vitro

Le cytosol est incubé 1 heure à 4°C avec 5 nM de chaque produit radioactif et déposé sur un gradient de sucrose.

L'amplitude des pics correspondant au récepteur 8S n'est pas dans le même ordre pour les différents composés dans ces deux expériences. Dans le cas a la liaison sur le récepteur 8S est proportionnelle à l'affinité alors que dans le cas b elle est proportionnelle à l'activité biologique.

b - Expériences in vivo

Après injection de 0,2 nm par rat de chaque produit radioactif, les utérus sont prélevés et le cytosol obtenu est directement déposé sur le gradient.

L'amplitude des pics correspondant au récepteur 8S n'est pas dans le même ordre pour les différents composés dans ces deux expériences. Dans le cas a la liaison sur le récepteur 8S est proportionnelle à l'affinité alors que dans le cas b elle est proportionnelle à l'activité biologique.

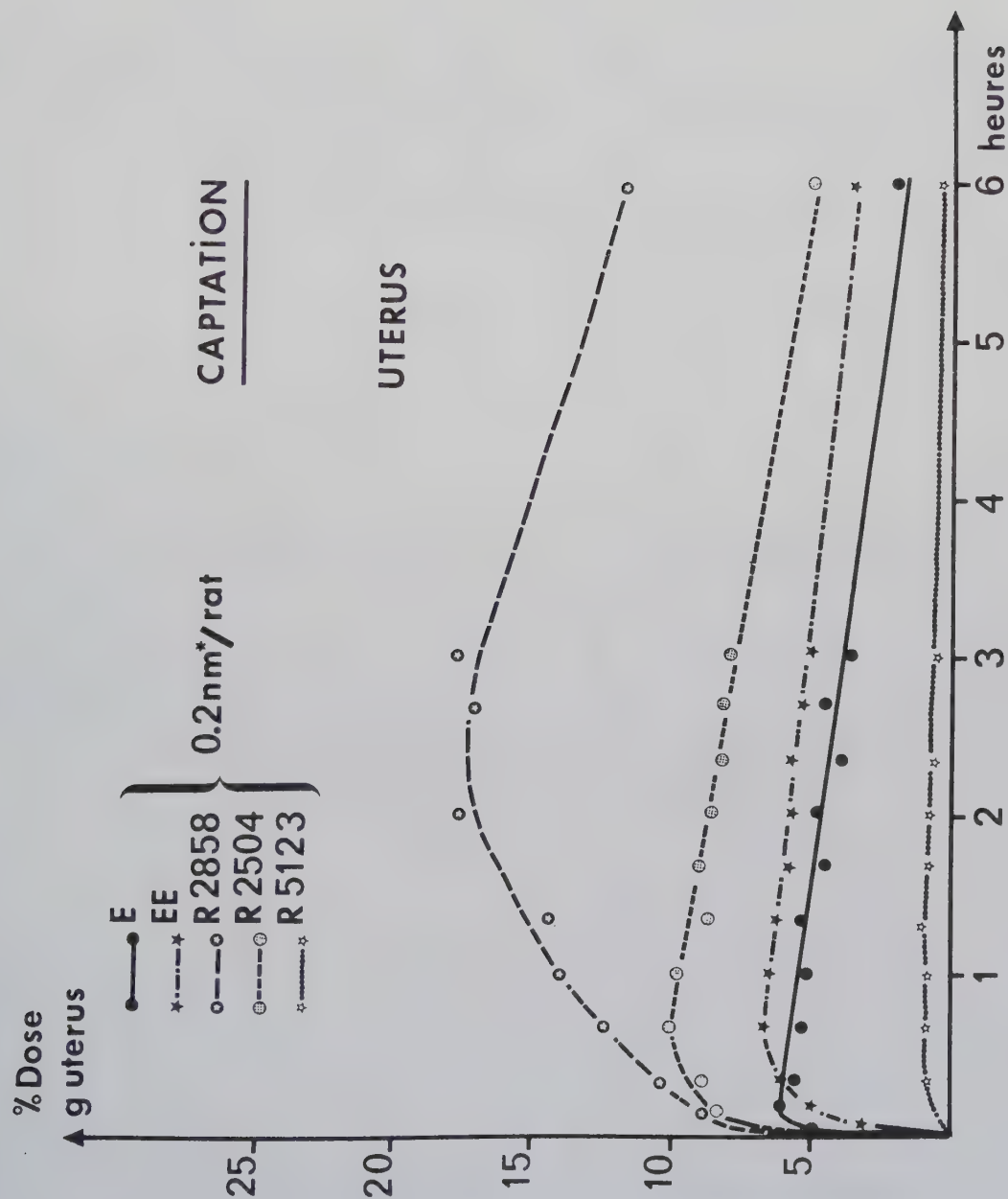


Fig. 29 - CAPTATION EN FONCTION DU TEMPS DE E, EE, 11ME, 11MEE, ET 3,17ME

La radioactivité présente dans l'utérus de rates impubères âgées de 19-21 jours après injection de 0,1 nM de chaque produit est représentée en fonction du temps. La captation dans l'utérus est en relation directe avec l'activité utérotrrophique. Les dérivés 11 méthoxylés sont les plus captés alors que le maximum de la courbe apparaît le plus rapidement pour l'oestradiol.

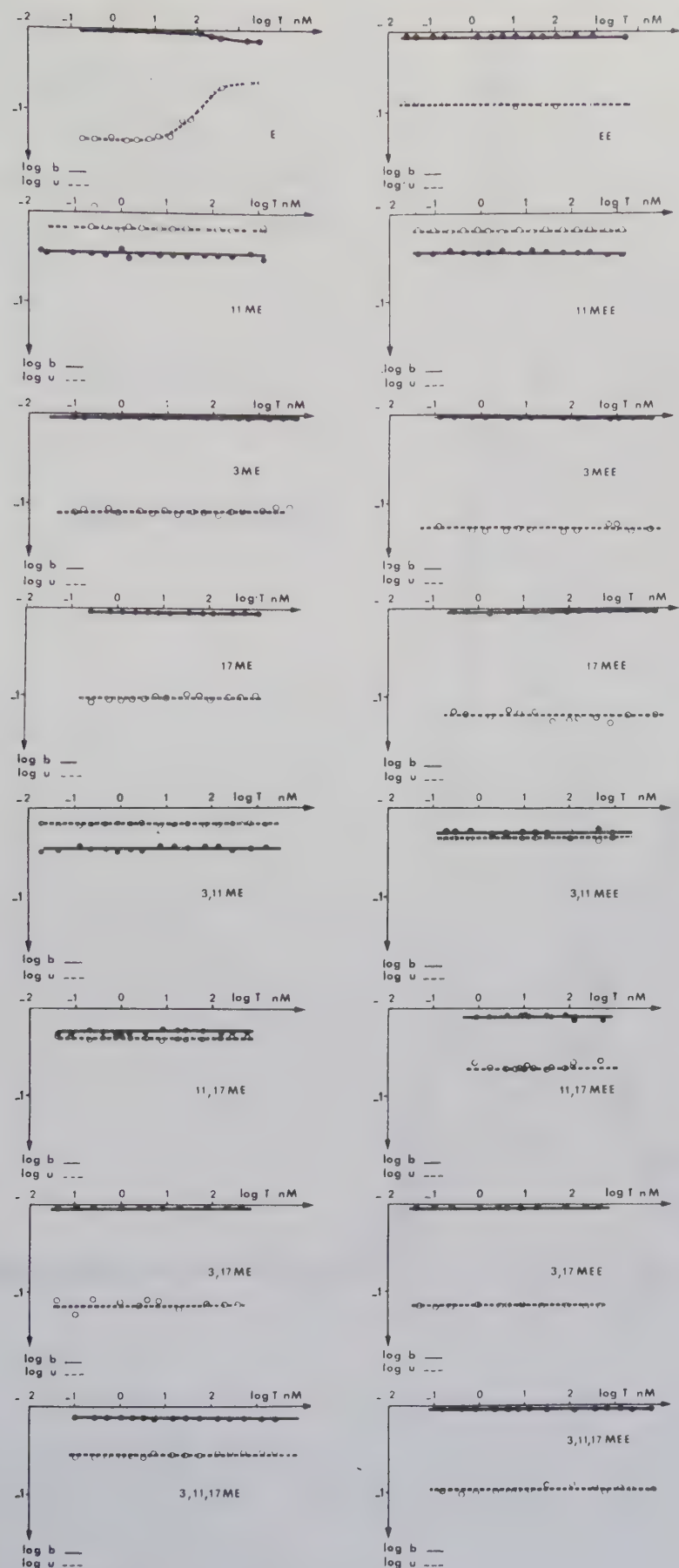


Fig. 30 - REPRESENTATION PAR LE GRAPHIQUE PROPORTIONNEL DE LA LIAISON DE TOUS LES DERIVES AU PLASMA DE RATE IMPUBERE

Dans le plasma de rat dilué au 1/20, la liaison des 16 dérivés mesurée par dialyse à l'équilibre à 4°C montre que seul l'oes-tradiol possède une liaison spécifique.

rapport liaison spécifique/liaison non spécifique est faible dans le plasma.

Pour préciser la spécificité de la liaison de l'éthynyl-oestradiol des expériences de compétition sont réalisées. Comme le pourcentage de liaison observé pour l'oestradiol est très élevé dans le plasma dilué au 1/20, la dilution 1/100 est utilisée. Les résultats, indiqués dans le tableau 4, montrent que si l'oestradiol froid entre en compétition avec l'oestradiol radioactif, l'effet de l'éthynyl-oestradiol est très faible et il est nul pour les dérivés 11 méthoxylés. Si l'éthynyl-oestradiol est utilisé comme ligand radioactif on n'observe aucun effet compétiteur. En conclusion, seul l'oestradiol possède une liaison spécifique importante dans le plasma, le pic observé en gradient pour l'éthynyl-oestradiol correspondant essentiellement à une importante liaison non spécifique. Ceci explique, à la fois, la présence et l'amplitude de ce pic plus faible que celui correspondant à l'oestradiol.

Afin de comparer liaison plasmatique et liaison tissulaire de l'oestradiol, les paramètres de la liaison, entre oestradiol et protéines du plasma de rate impubère, sont mesurés en utilisant trois dilutions du plasma (1/50, 1/100, 1/200). Les résultats obtenus sont représentés sur le tableau 5. Le nombre de sites N_S et le produit $K_{NS} N_{NS}$ suivent la loi de dilution, tandis que la constante intrinsèque d'association reste inchangée sous l'effet de la dilution. Cette liaison spécifique a une constante d'association environ 10 fois plus faible que celle obtenue pour le récepteur cytosoluble et est environ égale à celle de la SBP. Le nombre de sites calculé, bien que supérieur à celui de la SBP dans le plasma humain, reste dans les concentrations de sites des protéines spécifiques et ne peut être comparé à celui de l'albumine.

LIAISON NON SPECIFIQUE DANS L'UTERUS ET DANS LE PLASMA

La liaison non spécifique exprimée par le produit $(K_{NS} N_{NS})_p$ dans le plasma et $(K_{NS} N_{NS})_U$ dans l'utérus est calculée à partir des courbes, par la méthode décrite dans la première partie. Les valeurs observées sont en relation avec la polarité des stéroïdes et le coefficient de partage de chaque

ETUDES DE COMPETITION (PLASMA DE RATE IMPUBERE 1/100)

OESTRADIOL *

	10 nM	100 nM	1000 nM
E	18	38	48
EE	4	6	33
11 ME	10	4	8
11 MEE	0	0	0

ETHYNYLOESTRADIOL *

E	2	2	6
EE	2	4	7
11 ME	2	2	0
11 MEE	3	0	0

TABLEAU 4

Le plasma de rate impubère dilué au $\frac{1}{100}$ est incubé avec 0,15nM soit d'E, soit d'EE radioactif. Ces deux composés sont choisis, car d'après les résultats d'ultracentrifugation (figure 31), ils sont fixés sur un ensemble de protéines dans la région 4-5 S. Les valeurs dans le tableau indiquent le pourcentage de diminution de la fraction liée obtenue après addition, soit à E soit à EE radioactifs, de 10, 100, 1000nM de E, EE, 11 ME et 11 MEE froid. A la précision expérimentale près, il n'y a pas d'effet compétiteur avec l'éthynyl-oestradiol comme ligand. Pour l'estradiol, ce n'est que pour 1000 nM que EE devient compétiteur, tandis que 11 ME et surtout 11 MEE n'ont pratiquement aucun effet.

LIAISON DE L'OESTRADIOL AU PLASMA DE RATE IMPUBERE

DILUTION	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$
$N_S \cdot 10^{-9}M$	19 ± 3	$8,6 \pm 1,5$	$3,4 \pm 0,5$
$K_S \cdot 10^9 M^{-1}$	$0,22 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,04$
$K_{NS} N_{NS}$	$0,92 \pm 0,12$	$0,48 \pm 0,07$	$0,25 \pm 0,02$

TABLEAU. 5

Trois dilutions du plasma sont utilisées ($\frac{1}{50}$ - $\frac{1}{100}$ - $\frac{1}{200}$). Les paramètres de la liaison, concentration des sites de liaison spécifique N_S , constante intrinsèque d'association K_S et liaison non spécifique, calculés à partir de la mesure de la liaison par dialyse à l'équilibre à 4°C, sont indiqués, avec leur écart type, dans le tableau.

La constante K_S est indépendante de la dilution, tandis que le nombre de sites N_S suit cette dilution.

composé entre eau et huile. Les résultats sont résumés dans le tableau 6. Les plus faibles fixations sont observées pour les stéroïdes possédant deux hydroxyles, tandis que la méthylation des hydroxyles augmente cette fixation. Par contre, la substitution en 11 par un méthoxyle, la diminue de façon très appréciable, dans tous les cas.

LIAISON NON SPECIFIQUE DANS LE PLASMA ET DANS L'UTERUS

	$(K_{NS}^{N_{NS}})_P$	$(K_{NS}^{N_{NS}})_U$	PARTAGE
E	3,1	1,0	0,75
11 ME	0,5	0,1	0,85
3 ME	12,0	6,8	0,35
17 ME	9,0	2,6	0,23
3,11 ME	0,5	0,2	0,54
11,17 ME	1,1	0,9	0,46
3,17 ME	20,0	7,8	0,10
3,11,17 ME	2,6	1,1	0,14
EE	6,9	0,9	0,50
11 MEE	0,6	0,1	0,64
3 MEE	18,0	6,9	0,25
17 MEE	15,0	5,0	0,36
3,11 MEE	1,2	0,6	0,36
11,17 MEE	3,8	3,2	0,60
3,17 MEE	13,0	4,6	0,11
3,11,17 MEE	8,2	3,9	0,10

TABLEAU 6

Les valeurs indiquées dans les deux premières colonnes correspondent au paramètre de la liaison non spécifique dans le plasma et dans l'utérus calculé à partir des résultats de la figure 30 pour $(K_{NS}^{N_{NS}})_P$ et de la figure 25 $(K_{NS}^{N_{NS}})_U$. Les valeurs dans la troisième colonne sont calculées à partir du coefficient de partage entre huile et eau.

Les valeurs correspondent au rapport du coefficient de partage huile/eau, lorsque le stéroïde est initialement mis dans l'huile, au coefficient de partage huile/eau, lorsque le stéroïde est mis initialement dans l'eau.

DISCUSSION

Les expériences décrites dans les chapitres 1 et 2, mettent en évidence une relation entre captation et activité biologique. Par contre, il est impossible de dégager une relation entre captation ou activité biologique *in vivo* et fixation sur le récepteur *in vitro*.

En effet, des composés actifs comme le 3,11,17 MEE ou le 3,11 MEE ne se fixent pas spécifiquement *in vitro*.

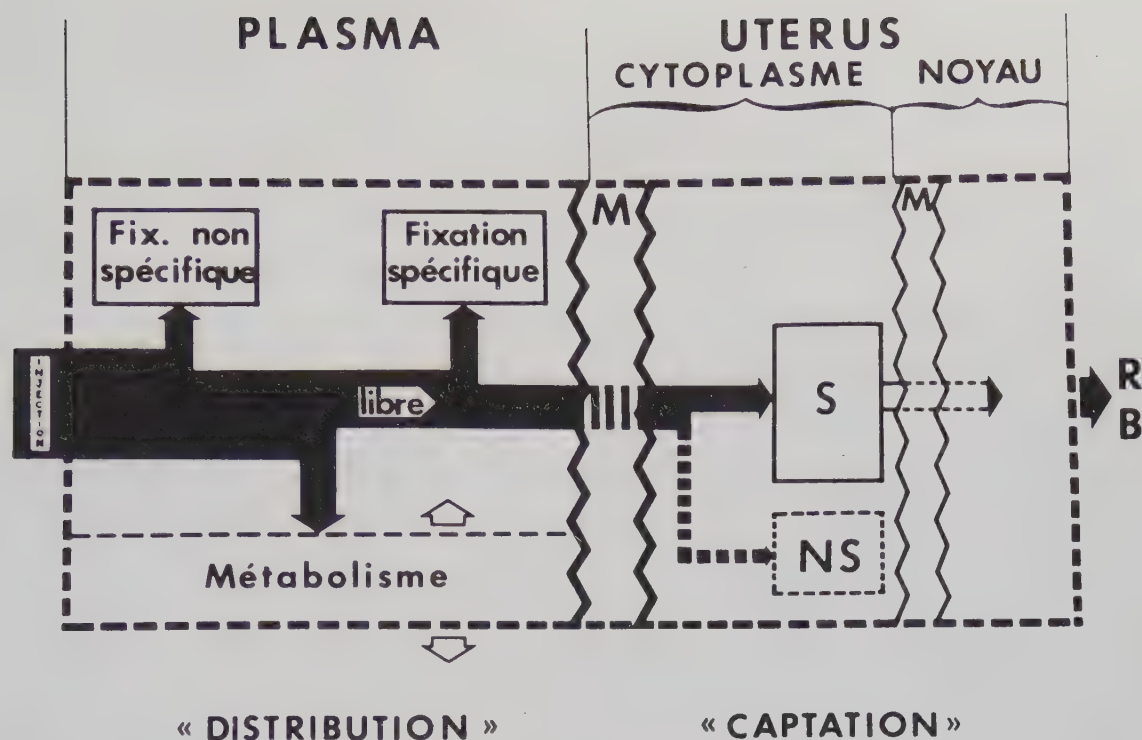
Toutefois, les études de captation décrites ne tiennent compte que de la radioactivité totale. L'identification du stéroïde capté et retenu par l'utérus montre que la courbe de rétention est due uniquement à un stéroïde se fixant spécifiquement *in vitro* sur le récepteur. Par exemple, le 3,11,17 MEE ou le 3,11 MEE se métabolisent, *in vivo*, pour donner le 11 MEE et la radioactivité retenue dans l'utérus correspond à la fixation de ce 11 MEE. Ainsi tout composé actif, sans affinité, *in vitro*, pour le récepteur cytosolique, doit être métabolisé pour pouvoir être retenu par l'organe cible et déclencher la réponse biologique.

Ces remarques sur le métabolisme et sur l'interaction stéroïde récepteur mettent en évidence la difficulté de dégager une relation entre un paramètre physicochimique mesuré *in vitro* et une activité biologique estimée *in vivo*.

Par contre, les relations entre tous ces résultats peuvent facilement se déduire du modèle représenté sur la figure 32. Ce modèle, proposé dans l'introduction, permet de relier les différentes notions développées dans les chapitres précédents.

On peut simplifier ce modèle en éliminant les composés qui deviennent actifs après dééthérisation, (cette forme de métabolisme est un paramètre supplémentaire qui permet de changer la distribution et de retarder la réponse biologique). L'étude est, de ce fait, limitée à E, EE, 11 ME et 11 MEE. Le 3,11 ME est inclu comme témoin dans cette discussion, car il est pratiquement inactif.

Pour ces cinq produits, les résultats décrits dans les chapitres précédents sont exprimés en valeur relative et représentés sous forme de tableau (figure 32). Le tableau est conçu



	PLASMA		M	UTERUS		
	libre	metab.		affinité	capt.	activité

Fig.32- MODELE PHARMACODYNAMIQUE ET TABLEAU DE RESULTATS

Pour E, EE, 11ME, 11MEE et 3,17ME les résultats déduits des interactions stéroïdes-protéines plasmatiques, du métabolisme, du passage membranaire, de l'affinité pour le récepteur 8 S, de la captation et de l'activité biologique sont exprimés en valeur relative par rapport à E. Ce tableau de résultats reprend la disposition du modèle pharmacodynamique pour expliquer l'activité biologique de ces stéroïdes.

pour correspondre au modèle c'est-à-dire qu'il comprend toutes les notions étudiées dans les chapitres précédents.

. Dans le compartiment plasmatique, les secteurs circulaires noirs représentent le pourcentage de stéroïde à l'état libre, tandis que les secteurs circulaires pointillés, l'importance du métabolisme.

. Dans la membrane (M), les secteurs circulaires noirs représentent le pourcentage de stéroïde à l'état libre après métabolisme, tandis que les flèches indiquent, par leur épaisseur, la facilité avec laquelle le stéroïde peut traverser la membrane. L'évaluation du passage membranaire (M) est difficile et est estimée par la valeur du partage de ces stéroïdes entre l'eau et l'huile.

. Dans l'utérus, les doubles flèches représentent l'affinité du stéroïde pour le récepteur⁸ S¹cytosoluble utérin, la grosseur des flèches traduisant la valeur de la constante intrinsèque d'association. Les carrés noirs et blancs représentent la captation et l'activité utéro-trophique, les surfaces des carrés de l'oestradiol étant prises comme surface unité.

Ce tableau permet de dégager une relation structure-activité. A partir de l'oestradiol on peut, en effet, étudier les modifications des différents facteurs après introduction d'un radical 17α éthyne ou/et d'un radical 11β méthoxyle.

Le 17α éthyne (EE) augmente la fraction de stéroïde libre, diminue le métabolisme et augmente l'affinité pour le récepteur. Tous ces effets positifs doivent donc conduire à une activité beaucoup plus forte, mais cette substitution en changeant la lipophilie de la molécule rend son passage membranaire plus difficile et ainsi l'activité n'augmente que dans le rapport 1,4. La substitution par le 11β méthoxyle (11 ME) se traduit par une forte augmentation de la fraction libre. Malgré un passage membranaire plus faible et une diminution notable de l'affinité pour le récepteur, elle conduit à une augmentation de l'activité dans le rapport 2. Les effets positifs de ces deux substitutions se retrouvent avec la molécule 11 MEE, la plus active de la série.

Par contre, la substitution des groupements hydroxyles en 3 et 17 par des groupements méthyles conduit à peu de modification dans le plasma, un passage membranaire très difficile et une affinité presque nulle. Finalement, ce composé est pratiquement inactif.

CONCLUSION

DISTRIBUTION ET ACTION

La substitution en position 11 par un radical méthoxyle conduit à des dérivés de l'oestradiol et de l'éthynyloestradiol très actifs. Il est normal d'essayer d'expliquer cette activité par une action moléculaire sur les protéines réceptrices que l'on sait impliquées dans le mécanisme d'action des oestrogènes. Une mesure précise des interactions stéroïdes-protéines dans ces situations complexes où plusieurs protéines liantes sont présentes simultanément, est indispensable. La technique de mesure et la représentation graphique décrites dans la première partie, permettent d'estimer, visualiser et analyser avec précision ces interactions spécifiques et non spécifiques. Cependant, comme le montre la deuxième partie, une étude limitée à l'interaction du stéroïde avec une protéine, aussi spécifique soit elle, ne peut rendre compte de l'activité biologique, car la distribution du stéroïde avant sa fixation sur des récepteurs conditionne son mécanisme d'action. Cette distribution inclut la polarité, le métabolisme mais aussi la fixation sur des protéines plasmatiques. Ainsi, il existe des relations entre interactions plasmatiques, interactions tissulaires, distribution et action.

PROTEINES TISSULAIRES ET ACTION

Les études de captation permettent de mettre en évidence une rétention du stéroïde dans certains tissus comme, ici, l'utérus. Puisqu'il existe une relation entre cette captation et l'activité utéro-trophique, ceci indique la présence de récepteurs. Ces derniers sont étudiés *in vitro* afin de rechercher leur spécificité vis à vis de différents stéroïdes.

Bien que les interactions spécifiques dans l'utérus se fassent avec les protéines cytosolubles ou nucléaires, les interactions décrites sont celles des oestrogènes avec les protéines cytosolubles, car il n'existe pas d'oestrogènes qui ne se fixent pas sur ces protéines. Par exemple, dans la série étudiée, tout stéroïde actif se fixe sur les protéines cytosolubles. Il faut évidemment tenir compte du métabolisme possible c'est-à-dire vérifier la structure du stéroïde capté. La liaison aux protéines tissulaires *in vitro*, est donc reliée à la fixation *in vivo*, c'est-à-dire à l'activité biologique.

Ces protéines cytosolubles agissent ainsi comme un système tout ou rien.

PROTEINES PLASMATIQUES ET DISTRIBUTION

La très faible liaison plasmatique des dérivés 11-méthoxylés permet d'expliquer une activité biologique plus grande que E et EE malgré une plus faible affinité pour le récepteur "8 S". Ceci vérifie l'hypothèse proposée par, *Peterson (1959)*, *Sandberg et Slaunwhite (1959)*, à savoir : LES COMPLEXES STEROIDES-PROTEINES SONT PHYSIOLOGIQUEMENT INACTIFS ET SEULE LA MOLECULE LIBRE EST L'HORMONE ACTIVE. Cette hypothèse est vérifiée dans de nombreux cas. Au cours de la grossesse, alors que le cortisol total augmente, la fraction libre ainsi que l'activité surrénalienne restent inchangées (*Peterson et coll. (1960)*). Après administration d'oestrogènes, *Taliaferro, Cobey et Leone (1956)*, *Wallace, Silverberg et Carter (1957)*, le cortisol plasmatique augmente, la fraction libre reste constante, car la capacité de liaison des protéines augmente (*Mills et coll. 1960*). Sous l'influence de la thyroxine chez le rat, la corticostérone libre reste constante, la corticostérone totale augmente ainsi que

la capacité de liaison de la transcortine, *Labrie, Pelletier, Raynaud, Ducommun et Fortier (1969)* montrant ainsi que le feed-back négatif, *Sayers et Sayers (1948)* est sous la dépendance du stéroïde libre.

La liaison plasmatique intervient également dans le METABOLISME (épuration et dégradation).

Pour l'épuration rénale, *West, Tyler et Brown (1951)* pensent que le taux de liaison important de la testostérone à l'albumine peut expliquer l'épuration limitée de ce composé dans le rein alors que la faible capacité de liaison des glucuronides hautement polaires et hydrophiles explique leur rapide excrétion urinaire. Pour l'épuration plasmatique, *Wallace et coll. (1957)*, *Robertson, Stiefel et Laidlaw (1959)*, *Peterson et coll. (1960)*, *Mills et coll. (1960)* mettent en évidence une diminution dans le taux d'épuration plasmatique du cortisol pendant la grossesse ou chez des sujets traités aux oestrogènes. La liaison aux protéines plasmatiques limite donc la diffusion du stéroïde *Bradley et Waterhouse (1966)*. *Raynaud, Fabre, Jung et Baulieu (1967)*, *Raynaud (1970c)* montrent que le volume initial dans lequel le stéroïde se distribue instantanément après une injection intraveineuse est, pour des dérivés de la testostérone ne se fixant pas sur la SBP, largement augmenté par rapport à celui de la testostérone.

Si la dissociation des complexes est lente, comme c'est le cas pour les protéines plasmatiques spécifiques, seule la fraction libre sera soumise à l'action enzymatique, les protéines jouant un rôle de "PROTECTION DU METABOLISME", *Mills et Bartter (1959)*, *Peterson et Coll. (1960)*. *Appleby et Norymberski (1957)*, montrent par exemple, qu'au cours de la grossesse, malgré les très fortes concentrations de cortisol plasmatique, l'excrétion urinaire des métabolites du cortisol n'est pas augmentée.

Enfin, les protéines plasmatiques spécifiques peuvent être des PROTEINES DE TRANSPORT en particulier pour transférer les stéroïdes du plasma vers les cellules, *De Hertogh (1970)*. *Keller, Richardson et Yates (1969)* montrent que ce transport peut varier selon les tissus plus ou moins perméables aux protéines plasmatiques. Mais, la présence de protéines liantes plasmatiques dans les liquides biologiques ou les tissus cibles n'implique pas forcément pour ces protéines, un rôle de transporteur. S'il est indispensable qu'un stéroïde soit lié

spécifiquement à ces protéines pour pouvoir pénétrer dans les cellules de l'organe cible, on ne comprend pas pourquoi les dérivés 11 β méthoxylés de l'oestradiol et de l'éthynyloestradiol qui ne sont pas liés dans le plasma, peuvent y pénétrer.

Les protéines plasmatiques peuvent donc moduler la réponse biologique en modifiant la distribution du stéroïde. Une faible liaison conduit à une concentration élevée du stéroïde sous forme libre, à une diffusion rapide mais aussi à un métabolisme important qu'il est nécessaire de protéger par des substitutions chimiques adéquates. Une forte liaison non spécifique ou la présence d'une liaison spécifique retient le stéroïde dans le plasma, le protège partiellement du métabolisme et en contrôlant la forme libre limite son action. Il est intéressant de noter que dans la série étudiée seule l'hormone endogène présente cette liaison spécifique.

En conclusion, la quantité de stéroïde fixé sur un récepteur dépend à la fois de la constante d'association et de la présence de stéroïde libre à proximité de ce récepteur. Il est donc nécessaire de favoriser la concentration d'un stéroïde sous sa forme libre, en modifiant la structure du stéroïde pour diminuer son métabolisme, lui permettre de diffuser facilement à travers les membranes biologiques et limiter sa fixation sur les protéines autres que celles assimilables à un récepteur.

L'interaction de l'oestrogène avec le récepteur cytosoluble est une étape déterminante dans la réponse oestrogénique. Les études de métabolisme montrent que, seuls E, EE, 11 ME et 11 MEE sont retenus *in vivo* dans l'utérus et les mesures d'interactions mettent en évidence la forte affinité de ces quatre composés pour le récepteur "8 S". La fixation sur les protéines cytosolubles "4 S" n'est pas observée pour les dérivés 11 méthoxylés laissant supposer que cette interaction a un rôle secondaire. (*In vivo*, à dose physiologique, aucun des quatre produits n'interagit spécifiquement avec les protéines "4 S"). La fixation spécifique dans le plasma n'intervient pas pour les dérivés 11 méthoxylés ; elle n'est donc pas indispensable pour l'activité biologique.

BIBLIOGRAPHIE

- ABELSON, D., DEPATIE, C. and CRADDOCK, V. (1960) : Interactions of Testosterone with Amino Acids. Arch. Biochem. Biophys., 91, 71.
- AIZAWA, Y. and MUELLER, G.C. (1961) : The Effect in Vivo and in Vitro of Estrogens on Lipid Synthesis in the Rat Uterus. J. Biol. Chem., 236, 381.
- ALBERGA, A. et BAULIEU, E.E. (1965) : Concentration elective de l'oestradiol dans l'endomètre chez la Ratte. C.R. Acad. Sc. Paris, 261, 5226.
- ALBERGA, A. and BAULIEU, E.E. (1968) : Binding of Estradiol in Castrated Rat Endometrium in Vivo and in Vitro. J. of Mol. Pharm., 4, 311.
- ALBERGA, A. (1970) : A Chromatin Estradiol Receptor in Calf Endometrium.
In : Third Int. Congr. on Hormonal Steroids, HAMBOURG, 1970, Excerpta Med. International Congress Series, 210, 151.
- ALBERGA, A., MASSOL, N., RAYNAUD, J.P. and BAULIEU, E.E. (1971) : Estradiol Binding of Exceptionnally High Affinity by a Non Histone Chromatin Protein Fraction. (en préparation)
- ALFSEN, A. (1963) : Etude de la liaison Testosterone-Sérumalbumine et action de l'heptane sur la molécule de Serumalbumine. C.R. du Lab. Carlsberg, 33, 415.
- ANDERSON, C.H. and GREENWALD, G.S. (1969) : Autoradiographic Analysis of Estradiol Uptake in the Brain and Pituitary of the Female Rat. Endocrinology, 85, 1160.
- ARIENS, E.J. (1966) : Receptor Theory and Structure-Action Relationships. Adv. Drug. Res., 3, 235.
- ARIENS, E.J. (1969) : Modulation of Pharmacokinetics by Modification of the Various Factors Involved. II Farmaco, Ed. Sc., 24, 3.
- ASTWOOD, E.B. (1938) : A Six-hour Assay for the Quantitative Determination of Estrogen. Endocrinology, 23, 25.
- ATKINSON, D.E. (1966) : Regulation of Enzyme Activity. Annu. Rev. Biochem., 35, (part 1), 611.
- ATTALLAH, N.A. and LATA, G.F. (1968) : Steroid-Protein Interactions Studied by Fluorescence Quenching. Biochem. Biophys. Acta, 168, 321.
- ATTRAMADAL, A. (1969) : The Uptake and Localization of ³H-Oestradiol in the Hypothalamus of Male and Female Rats. Acta Endocrinol., Suppl. 138, 194.
- AUGUST, G.P., TKACHUK, M. and GRUMBACH, M.M. (1969) : Plasma Testosterone-Binding Affinity and Testosterone in Umbilical Cord Plasma, Late Pregnancy, Prepubertal Children, and Adults. J. Clin. Endocrinol. Metabol., 29, 891.
- BARBER, H.E., WELCH, B.L. and MACKAY, D. (1967) : The Use of the Logarithmic Transformation in the Calculation of the Transport Parameters of a System that Obeys Michaelis-Menten Kinetics, Biochem. J., 103, 251.

- BASSET, J.M. and HINKS, N.T. (1969) : Micro-Determination of Corticosteroids in Ovine Peripheral Plasma : Effects of Venipuncture, Corticotrophin, Insulin and Glucose. *J. Endocrinol.*, 44, 387.
- BAULIEU, E.E., ALBERGA, A. et JUNG, I. (1967a) : Liaison spécifique de l'Oestradiol à des protéines utérines. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, 265, 354.
- BAULIEU, E.E., ALBERGA, A. et JUNG, I. (1967b) : Liaison de divers oestrogènes à des protéines utérines. Une méthode de dosage de l'oestradiol. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, 265, 501.
- BAULIEU, E.E. and RAYNAUD, J.P. (1969) : The Use of Radioactive Steroids for the Study of Transport and Receptor Proteins. *Progr. Biochem. Pharmacol.*, 5, 46.
- BAULIEU, E.E., RAYNAUD, J.P. and MILGROM, E. (1970a) : Measurement of Steroid Binding Proteins. In : Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology. 2nd Symposium : Steroid Assay by Protein Binding. E. Diczfalussy, Ed. *Acta Endocrinol. Suppl.* 147, 104.
- BAULIEU, E.E. and RAYNAUD, J.P. (1970b) : A "Proportion Graph" Method for Measuring Binding Systems. *Eur. J. Biochem.* 13, 293.
- BAULIEU, E.E., ALBERGA, A., JUNG, I., LEBEAU, M.C., MERCIER-BODARD, C., MILGROM, E., RAYNAUD, J.P., RAYNAUD-JAMMET, C., ROCHEFORT, H., TRUONG-RICHARD-FOY, H. and ROBEL, P. (1971) : Metabolism and Protein Binding of Sex Steroids in Target Organs : an Approach to the Mechanism of Hormone Action. *Rec. Prog. Horm. Res.* (sous presse)
- BELLEAU, B. (1964) : A Molecular Theory of Drug Action Based on Induced Conformational Perturbations of Receptors. *J. Medicin. Chem.*, 7, 776.
- BEST-BELPOMME, M., FRIES, J. et ERDOS, T. (1970) : Interactions entre l'oestradiol et des sites récepteurs utérins. *Eur. J. Biochem.*, 17, 425.
- BISCHOFF, F. and PILHORN, H.R. (1948) : The State and Distribution of Steroid Hormones in Biologic Systems. Solubilities of Testosterone, Progesterone and α -Estradiol in Aqueous Salt and Protein Solution and in Serum. *J. Biol. Chem.*, 174, 663.
- BLATT, W.F., ROBINSON, S.M. and BIXLER, H.J. (1968) : Membrane Ultrafiltration : the Diafiltration Technique and its Application to Microsolute Exchange and Binding Phenomena. *Anal. Biochem.*, 26, 151.
- BLISS, C.I. and JAMES, A.T. (1966) : Fitting the Rectangular Hyperbola. *Biometrics*, 22, 573.
- BOOTH, M., DIXON, P.F., GRAY, C.H., GREENAWAY, J.M. and HOLNESS, N.J. (1961) : Protein Binding of Cortisol in Health and in Pregnancy. *J. Endocrinol.*, 23, 25.
- BOX, G.E.P. (1960) : Fitting Empirical Data. *Ann. New-York Acad. Sci.*, 86, 792.
- BOURQUIN, D., AZADIAN-BOULANGER, G., PHILIBERT, D. and RAYNAUD, J.P. (1970) : R-2858, A Highly Potent Estrogenic Compound. In : Third Int. Congr. on Hormonal Steroids, HAMBURG, 1970. Excerpta Med. International Congress Series, 210, 151.
- BRAUNSBURG, H. and JAMES, V.H.T. (1967) : Mathematical Analysis of Experiments with Labeled Hormone Tracers : Problems of Interpreting Tissue Radioactivity. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 27, 1174.
- BRELCHER, P.I., VIGERSKY, R., WOTIZ, H.S. and WOTIZ, H.H. (1967a) : An *In Vitro* System for the Binding of Estradiol to Rat Uterine Nuclei. *Steroids*, 10, 635.

- BRECHER, P.I. and WOTIZ, H.H. (1967b) : Competition between Estradiol and Estriol for end Organ Receptor Proteins. *Steroids*, 9, 431.
- BRECHER, P.I. and WOTIZ, H.H. (1968) : Stereospecificity of the Uterine Nuclear Hormone Receptors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 128, 470.
- BRECHER, P.I., PASQUINA, A. and WOTIZ, H.H. (1969) : Effect of Metal Ions on Estradiol Binding to Uterine Nuclear Receptors. *Endocrinology*, 85, 612.
- BRUNKHORST, W.K. and HESS, E.L. (1965) : Interaction of Cortisol with Serum Albumins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 111, 54.
- BRUSH, M.G., TAYLOR, R.W. and KING, R.J.B. (1967) : The Uptake of (6,7-³H) Oestradiol by the Normal Human Female Reproductive Tract. *J. Endocrinol.*, 39, 599.
- BURSTEIN, S.H. (1969) : The Removal of Testosterone Binding Globulin from Plasma by Affinity Chromatography. *Steroids*, 14, 263.
- CARR, I. and WILLIAMS, M.A. (1969) : Binding of Tritiated Oestradiol by Certain Cells in Autonomic Ganglia in the Mouse. *J. Endocrinol.*, 43, 131.
- CECIL, H.C., HANNUM, J.A.Jr. and BITMAN, J. (1966) : Quantitative Characterization of Uterine Vascular Permeability Changes with Estrogen. *Amer. J. Physiol.*, 211, 1099.
- CHADER, G.J. and WESTPHAL, U. (1968a) : Steroid-Protein Interactions. XVIII. Isolation and Observations on the Polymeric Nature of the Corticosteroid-Binding Globulin of the Rat. *Biochemistry*, 7, 4272.
- CHADER, G.J. and WESTPHAL, U. (1968b) : Steroid-Protein Interactions. XVI. Isolation and Characterization of the Corticosteroid Binding Globulin of the Rabbit. *J. Biol. Chem.*, 243, 928.
- CHEN, P.S. Jr., MILLS, I.H. and BARTTER, E.C. (1961) : Ultrafiltration Studies of Steroid-Protein Binding. *J. Endocrinol.*, 23, 129.
- CLELAND, W.W. (1967) : The Statistical Analysis of Enzyme Kinetic Data. *Adv. In Enzymol.*, 29, 1.
- COLE, D.F. (1950) : The Effects of Oestradiol on the Rat Uterus. *J. Endocrinol.*, 7, 12.
- COLOWICK, S.P. and WOMACK, F.C. (1969) : Binding of Diffusible Molecules by Macromolecules : Rapid Measurement by Rate of Dialysis. *J. Biol. Chem.*, 244, 774.
- CORKER, C.S. and EXLEY, D. (1969) : Competitive Protein Binding Assay of 17 β -Oestradiol in Human Peripheral Plasma. *J. Endocrinol.*, 43, XXX.
- DAUGHADAY, W.H. (1956a) : Binding of Corticosteroids by Plasma Proteins. II. Paper Electrophoresis and Equilibrium Paper Electrophoresis. *J. Clin. Invest.*, 35, 1434.
- DAUGHADAY, W.H. (1956b) : Evidence for Two Corticosteroid Binding Systems in Human Plasma. *J. Lab. Clin. Med.*, 48, 799.
- DAUGHADAY, W.H. (1958a) : Binding of Corticosteroids by Plasma Proteins. IV. The Electrophoretic Demonstration of Corticosteroid Binding Globulin. *J. Clin. Invest.*, 37, 519.
- DAUGHADAY, W.H. (1958b) : Binding of Corticosteroids by Plasma Proteins. III. The Binding of Corticosteroid and Related Hormones by Human Plasma and Plasma Protein Fractions as Measured by Equilibrium Dialysis. *J. Clin. Invest.*, 37, 511.

DAUGHADAY, W.H., KOZAK, I. and BIEDERMAN, O. (1959a) : Corticosteroid Binding Globulin Activity in Body Fluids and in Fetal and Maternal Plasma. *J. Clin. Invest.*, 38, 998.

DAUGHADAY, W.H. (1959b) : Steroid Protein Interactions. *Physiol. Rev.*, 39, 885.

DAUGHADAY, W.H., HOLLOSZY, J. and KOZAK-MARIZ, I. (1961) : Binding of Corticosteroids by Plasma Proteins. VI. The Binding of Cortisol and Aldosterone by Corticosteroid-Binding Globulin and by the Estrogen-Induced Binding System of Plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 21, 53.

DAUGHADAY, W.H., ADLER, R.E., KOZAK-MARIZ, I. and RASINSKI, D.C. (1962) : Measurement of the Binding Capacity of Corticosteroid Binding Globulin in Human Plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 22, 704.

DE MOOR, P., HEIRWEGH, K., HEREMANS, J.F. and DECLERCK-RASKIN, M. (1962) : Protein Binding of Corticoids Studied by Gel Filtration. *J. Clin. Invest.* 41, 816.

DE MOOR, P., STEENO, O., BROSENS, I. and HENDRIKX, A. (1966) : Data on Transcortin Activity in Human Plasma as Studied by Gel Filtration. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 26, 71.

DE MOOR, P. and HEYNS, W. (1968) : Cortisol Binding Affinity of Plasma Transcortin (CBA) as Studied by Competitive Adsorption. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 28, 1281.

DE MOOR, P., STEENO, O., HEYNS, W. and Van BAELEN, H. (1969) : The Steroid Binding β -globulin in Plasma : Pathophysiological Data. *Ann. Endocrinol.*, 30, 233.

DE SOMBRE, E.R., PUCA, G.A. and JENSEN, E.V. (1969) : Purification of an Estrophilic Protein from Calf Uterus. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 64, 1969.

DESH潘DE, N., JENSEN, V. and BULBROOK, R.D. (1967) : Accumulation of Tritiated Oestradiol by Human Breast Tissue. *Steroids*, 10, 219.

DOE, R.P. and SEAL, U.S. (1963) : Protein Binding of Cortisol in Man. *J. Clin. Invest.*, 42, 929.

DOE, R.P., FERNANDEZ, R. and SEAL, U.S. (1964) : Measurement of Corticosteroid-Binding Globulin in Man. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 24, 1029.

DORFMAN, R.I. and DORFMAN, A.S. (1954) : Estrogen Assays Using the Rat Uterus. *Endocrinology*, 55, 65.

DORFMAN, R.I. and KINCL, F.A. (1966) : Uterotrophic Activity of Various Phenolic Steroids. *Acta Endocrinol.*, 52, 619.

DRAY, F., MOWSZOWICZ, I., LEDRU, M.J., CREPY, O., DELZANT, G. et SEBAOUN, J. (1969a) : Anomalies de l'affinité de liaison de testostérone dans le sérum des sujets thyrotoxicosiques et dans le virilisme pileux idiopathique. Augmentation de l'affinité de liaison après administration d'hormones thyroïdiennes, chez le sujet dont l'affinité est normale ou basse. *Ann. Endocrinol.*, 30, 223.

DRAY, F. (1969b) : Physiopathologie de la liaison de la testostérone de l'oestradiol et du cortisol avec les protéines sériques. Dans : Métabolisme périphérique et transport humoral des hormones thyroïdiennes et stéroïdes. Colloque d'endocrinologie Xre réunion des endocrinologues de langue française. Doin et Masson, eds., Paris, 159.

EADIE, G.S. (1942) : The Inhibition of Cholinesterase by Physostigmine and Prostigmine. *J. Biol. Chem.*, 146, 85.

EDSALL, J.T. and WYMAN, J. (1958) : Some General Aspects of Molecular Interactions. In : *Biophysical Chemistry*. Academic Press, N.Y., 1, 591.

- EHRENPREIS, S., FLEISCH, J.H. and MITTAG, T.W. (1969) : Approaches to the Molecular Nature of Pharmacological Receptors. *Pharmacol. Rev.*, 21, 131.
- EIK-NES, K., SCHELLMAN, J.A., LUMRY, R. and SAMUELS, L.T. (1954) : The Binding of Steroids to Protein. *J. Biol. Chem.*, 206, 411.
- EISENFELD, A.J. and AXELROD, J. (1967a) : Evidence for Estradiol Binding sites in the Hypothalamus. Effect of Drugs. *Biochem. Pharmacol.*, 16, 1781.
- EISENFELD, A.J. (1967b) : Computer Analysis of the Distribution of (³H) Estradiol. *Biochem. Biophys. Acta*, 136, 498.
- EISENFELD, A.J. (1970) : ³H-Estradiol : In Vitro Binding to Macromolecules from the Rat Hypothalamus, Anterior Pituitary and Uterus. *Endocrinology*, 86, 1313.
- EKINS, R.P. (1960) : The Estimation of Thyroxine in Human Plasma by an Electrophoretic Technique. *Clin. Chim. Acta*, 5, 453.
- EKINS, R.P., NEWMAN, G.B. and O'RIOURDAN, J.L.H. (1968) : In : Radioisotope in Medicine : In Vitro Studies. R.L. Hayes, F.A. Goswitz and B.E.P. Murphy, eds., U.S. Atomic Energy Commission. Symposium Series 13, 59.
- EMANUEL, M.B. and OAKLEY, R.E. (1969) : Effect of Zn on the Binding of Oestradiol -17 β to a Uterine Protein. *Nature*, 223, 66.
- EMMENS, C.W. (1962) : Estrogens. In : Methods in Hormones Research, R.I. Dorfman, ed., (2 e edit.) Academic Press, N.Y., 2, 59.
- EMMENS, C.W. and MARTIN, L. (1964) : Estrogens. In : Methods in Hormones Research, R.I. Dorfman, ed., Academic Press, N.Y., 3, 1.
- ERDOS, T. (1968a) : Properties of a Uterine Oestradiol Receptor. *Biochem. Biophys. Res. Communic.*, 32, 338.
- ERDOS, T., GOSPODAROWICZ, D., BESSADA, R. et FRIES, J. (1968b) : Propriétés d'un récepteur utérin de l'oestradiol. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 266, 2164.
- FLESHER, J.W. (1965) : Preferential Uptake of 6,7-³H-Estradiol by the Endometrium of the Rat Uterus. *Steroids*, 5, 737.
- FLORINI, J.R. and BUYSKE, D.A. (1961) : Plasma Protein Binding of Triamcinolone-³H and Hydrocortisone-4-¹⁴C. *J. Biol. Chem.*, 236, 247.
- FOLCA, P.J., GLASCOCK, R.F. and IRVINE, W.T. (1961) : Studies with Tritium-Labelled Hexoestrol in Advanced Breast Cancer. *Lancet*, 796.
- FOLMAN, Y. and POPE, G.S. (1969) : Uptake of Radioactivity by Uterus, Vagina and Skeletal Muscle of Immature Mice after Administration of (³H) Oestradiol. *J. Endocrinol.*, 44, 203.
- FOREST, M.G., RIVAROLA, M.A. and MIGEON, C.J. (1968) : Percentage Binding of Testosterone, Androstenedione and Dehydroisoandrosterone in Human Plasma. *Steroids*, 12, 323.
- FRICK, J. and KINCL, F.A. (1969) : The Measurement of Plasma Testosterone by Competitive Protein-Binding Assay. *Steroids*, 13, 495.
- FRIEDERICI, H.H.R. (1967) : The Early Response of Uterine Capillaries to Estrogen Stimulation. *Lab. Invest.*, 17, 322.

- GALA, R.R. and WESTPHAL, U. (1965a) : Corticosteroid-Binding Globulin in the Rat : Possible Role in the Initiation of Lactation. *Endocrinology*, 76, 1079.
- GALA, R.R. and WESTPHAL, U. (1965b) : Corticosteroid-Binding Globulin in the Rat : Studies on the Sex Difference. *Endocrinology*, 77, 841.
- GANGULY, M., CARNIGHAN, R.H. and WESTPHAL, U. (1967) : Steroid-Protein Interactions. XIV. Interaction between Human α -Acid Glycoprotein and Progesterone. *Biochemistry*, 6, 2803.
- GIORGI, E.P. and CROSIGNANI, P.G. (1969) : Competitive Binding of Free and Conjugated Oestrogens to Plasma Proteins. *J. Endocrinol.*, 44, 219.
- GLASCOCK, R.F. and HOEKSTRA, W.G. (1959) : Selective Accumulation of Tritium-Labelled Hexoestrol by the Reproductive Organs of Immature Female Goats and Sheep. *Biochem. J.*, 72, 673.
- GOLDIE, D.J., HASHAM, N., KEANE, P.M. and WALKER, W.H.C. (1968) : Temperature Dependence of Cortisol Binding to Plasma Proteins. *Nature*, 217, 852.
- GORSKI, J. and MUELLER, G.C. (1963a) : Early Effects of Estrogen on Acid-Soluble Nucleotides of the Rat Uterus. *Arch. Bioch. Biophys.*, 102, 21.
- GORSKI, J. and NICOLETTE, J.A. (1963b) : Early Estrogen Effects on Newly Synthesized RNA and Phospholipid in Subcellular Fractions of the Rat Uterus. *Arch. Biochem. Biophys.*, 103, 418.
- GORSKI, J. (1964) : Early Estrogen Effects on the Activity of Uterine Ribonucleic Acid Polymerase. *J. Biol. Chem.*, 239, 889.
- GORSKI, J., TOFT, D., SHYAMALA, G., SMITH, D. and NOTIDES, A. (1968) : Hormone Receptors : Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus. *Rec. Progr. Horm. Res.*, 24, 45.
- GREEN, R., LUTTGE, W.G. and WHALEN, R.E. (1969) : Uptake and Retention of Tritiated Estradiol in Brain and Peripheral Tissues of Male, Female and Neonatally Androgenized Female Rats. *Endocrinology*, 85, 373.
- GUERIGUIAN, J.L. and PEARLMAN, W.H. (1968) : Some Properties of a Testosterone-Binding Component of Human Pregnancy Serum. *J. Biol. Chem.*, 243, 5226.
- GUILLEMANT, S., THOMOPOULOS, P. et DESGREZ, P. (1969) : Techniques de dosages par compétition de quelques hormones stéroïdes. Dans : Métabolisme périphérique et transport humoral des hormones thyroïdiennes et stéroïdes. Colloque d'Endocrinologie. Xre réunion des endocrinologistes de langue française, Doin et Masson, eds., Paris, 139.
- HAARHOFF, K.N. (1969) : Use of Multivariate Non-Linear Regression Analysis in Fitting Enzyme Kinetic Models. *J. Theoret. Biol.*, 22, 117.
- HALLBERG, M.C., ZORN, E.M. and WIELAND, R.G. (1968) : A Sensitive Testosterone Assay by Protein-Binding. *Steroids*, 12, 241.
- HAMILTON, T.H. (1963) : Isotopic Studies on Estrogen-Induced Accelerations of Ribonucleic Acid and Protein Synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 49, 373.
- HAMILTON, T.H., WIDNELL, C.C. and TATA, J.R. (1968) : Synthesis of Ribonucleic Acid during Early Estrogen Action. *J. Biol. Chem.*, 243, 408.
- HANSCH, C. and DEUTSCH, E.W. (1966) : The Structure-Activity Relationship in Amides Inhibiting Photosynthesis. *Biochem. Biophys. Acta*, 112, 381.

- HANSON, K.R., LING, R. and HAVIR, E. (1967) : A Computer Program for Fitting Data to the Michaelis-Menten Equation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 29, 194.
- HART, H.E. (1965) : Determination of Equilibrium Constants and Maximum Binding Capacities in Complex in Vitro Systems : I. The Mamillary System. *Bull. of Mathematical Biophysics*, 27, 87.
- HERBERT, V., GOTTLIEB, C., LAU, K.S. and WASSERMAN, L.R. (1964) : Intrinsic-Factor Assay. *Lancet*, 2, 1017.
- DE HERTOOGH, R., EKKA, E., VANDERHEYDEN, I. and HOET, J.J. (1969) : In Vivo Study of the Exchange of Estradiol-17 β -6-7³H Between Plasma and Uterus in the Immature Rat. 7th Acta Endocrinologica Congress, *Acta Endocrinol.*, Suppl. 138, 79.
- DE HERTOOGH, R. (1970) : Clearance métabolique et captation tissulaire de l'oestrone et de l'oestradiol-17 β chez la Ratte non gravis. Thèse de Doctorat, eds., Vander, Louvain.
- HEYNS, W., Van BAELEN, H. and DE MOOR, P. (1967) : Study of Steroid-Protein Binding by Means of Competitive Adsorption : Application to Cortisol Binding in Plasma. *Clin. Chim. Acta*, 18, 361.
- HEYNS, W., Van BAELEN, H. and DE MOOR, P. (1969a) : Study of the Specificity of the Steroid-Binding β -Globulin in Human Plasma. *J. Endocrinol.*, 43, 67.
- HEYNS, W., VERHOEVEN, G., Van BAELEN, H. and DE MOOR, P. (1969b) : Measurement of Testosterone in Plasma by Competitive Protein Binding. *Ann. Endocrinol.*, 30, 153.
- HISAW, F.L. (1959) : Comparative Effectiveness of Estrogens on Fluid Imbibition and Growth of the Rat's Uterus. *Endocrinology*, 64, 276.
- HOFFMANN, W. and WESTPHAL, U. (1969) : Steroid-Protein Interactions. XXII. Extrapolation Technique for Determination of Corticosteroid-Binding Globulin by Gel Filtration. *Anal. Biochem.*, 32, 48.
- HORTON, R., KATO, T. and SHERINS, R. (1967) : A Rapid Method for the Estimation of Testosterone in Male Plasma. *Steroids*, 10, 245.
- INMAN, D.R., BANFIELD, R.E.W. and KING, R.J.B. (1965) : Autoradiographic Localization of Oestrogen in Rat Tissues. *J. Endocrinol.*, 32, 17.
- JENSEN, E.V. and JACOBSON, H.I. (1960) : Fate of Steroid Estrogens in Target Tissues. In : *Biological Activities of Steroids in Relation to Cancer*. G. Pincus and E.P. Vollmer, eds., Academic Press, N.Y., 161.
- JENSEN, E.V. and JACOBSON, H.I. (1962) : Basic Guides to the Mechanism of Estrogen Action. *Rec. Progr. Horm. Res.*, 18, 387.
- JENSEN, E.V. (1964) : Metabolic Fate of Sex Hormones in Target Tissues with Regard to Tissue Specificity. In : *Proc. of the Sec. Int. Congr. of Endocrinology*, LONDON, 1964, *Excerpta Med. International Congress Series*, 83, 420.
- JENSEN, E.V., DESOMBRE, E.R. and JUNGBLUT, P.W. (1966a) : Interaction of Estrogens with Receptor Sites "in vivo" and "in vitro". In : *Proc. of the Sec. Int. Congr. on Hormonal Steroids*, MILAN, 1966, *Excerpta Med. International Congress Series*, 132, 492.
- JENSEN, E.V., JACOBSON, H.I., FLESHER, J.W., SAHA, N.N., GUPTA, G.N., SMITH, Sylvia, COLUCCI, V., SHIPLACOFF, D., NEUMANN, H.G., DESOMBRE, E.R. and JUNGBLUT, P.W. (1966b) : Estrogen Receptors in Target Tissues. In : *Steroid Dynamics*. G. Pincus, T. Nakao and J.F. Tait, eds., Academic Press, N.Y., 133.

- JENSEN, E.V., SUZUKI, T., KAWASHIMA, T., STUMPF, W.E., JUNGBLUT, P.W. and DESOMBRE, E.R. (1968) : A two-Step Mechanism for the Interaction of Estradiol with Rat Uterus. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 59, 632.
- JENSEN, E.V., SUZUKI, T., NUMATA, M., SMITH, S. and DESOMBRE, E.R. (1969) : Estrogen-Binding Substances of Target Tissues. *Steroids*, 13, 417.
- KAHWANAGO, I., HEINRICHS, W.L.R. and HERMANN, W.L. (1969) : Isolation of Oestradiol "Receptors" from Bovine Hypothalamus and Anterior Pituitary Gland. *Nature*, 223, 313.
- KAHWANAGO, I., HEINRICHS, W.L.R. and HERMANN, W.L. (1970) : Estradiol "Receptors" in Hypothalamus and Anterior Pituitary Gland : Inhibition of Estradiol Binding by SH-Group Blocking Agents and Clomiphene Citrate. *Endocrinology*, 86, 1319.
- KALMAN, S.M. (1958a) : The Effect of Estrogens on Uterine Blood Flow in the Rat. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 124, 179.
- KALMAN, S.M. and LOWENSTEIN, J.M. (1958b) : The Effect of Estrogens on the Uptake of Albumin and Electrolytes by the Rat Uterus. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 122, 163.
- KARUSH, F. and SONENBERG, M. (1949) : Interaction of Homologous Alkyl Sulfates with Bovine Serum Albumin. *J. Amer. Chem. Soc.*, 71, 1369.
- KARUSH, F. (1950) : Heterogeneity of the Binding Sites of Bovine Serum Albumin. *J. Amer. Chem. Soc.*, 72, 2705.
- KARUSH, F. (1951) : The Study of Protein Binding by Partition Analysis. The Effect of Protein Charge. *J. Amer. Chem. Soc.*, 73, 1246.
- KATO, J. and VILLEE, C.A. (1967a) : Preferential Uptake of Estradiol by the Anterior Hypothalamus of the Rat. *Endocrinology*, 80, 567.
- KATO, J. and VILLEE, C.A. (1967b) : Factors Affecting Uptake of Estradiol-6,7-³H by the Hypophysis and Hypothalamus. *Endocrinology*, 80, 1133.
- KATO, J., KOBAYASHI, T. and VILLEE, C.A. (1968) : Effect of Clomiphene on the Uptake of Estradiol by the Anterior Hypothalamus and Hypophysis. *Endocrinology*, 82, 1049.
- KATO, J., INABA, M. and KOBAYASHI, T. (1969) : Variable Uptake of Tritiated Oestradiol by the Anterior Hypothalamus in the Postpubertal Female Rat. *Acta Endocrinol.*, 61, 585.
- KATO, J. (1970) : In vitro Uptake of Tritiated Oestradiol by the Anterior Hypothalamus and Hypophysis of the Rat. *Acta Endocrinol.*, 64, 687.
- KATO, T. and HORTON, R. (1968a) : Studies of Testosterone Binding Globulin. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 28, 1160.
- KATO, T. and HORTON, R. (1968b) : A Rapid Method for the Estimation of Testosterone in Female Plasma. *Steroids*, 12, 631.
- KELLER, N., SENDELBECK, L.R., RICHARDSON, U.I., MOORE, C. and YATES, F.E. (1966) : Protein Binding of Corticosteroids in Undiluted Rat Plasma. *Endocrinology*, 79, 884.
- KELLER, N., RICHARDSON, U.I. and YATES, F.E. (1969) : Protein Binding and the Biological Activity of Corticosteroids : In Vivo Induction of Hepatic and Pancreatic Alanine Aminotransferases by Corticosteroids in Normal and Estrogen-Treated Rats. *Endocrinology*, 84, 49.

- KILROE-SMITH, T.A. (1966) : A Modified Graphical Method for Determination of Equilibrium Constants. *Biochem. J.*, 100, 334.
- KING, R.J.B., GORDON, J., COWAN, D.M. and INMAN, D.R. (1966a) : The Intranuclear Localization of (6,7-³H)-Oestradiol-17 β in Dimethyl-Benzanthracene Induced Rat Mammary Adenocarcinoma and other Tissues. *J. Endocrinol.*, 36, 139.
- KING, R.J.B. and GORDON, J. (1966b) : The Localization of (6,7-³H) Oestradiol-17 β in Rat Uterus. *J. Endocrinol.*, 34, 431.
- KING, R.J.B., GORDON, J. and MARTIN, L. (1968a) : The Location of (6,7-³H) Oestradiol-17 β in Mouse Vagina. *J. Endocrinol.*, 41, 223.
- KING, R.J.B. and GORDON, J. (1968b) : An Attempt to Isolate an Oestradiol Receptor from Nuclei by Adsorption on Oestradiol-17 β . *J. Endocrinol.*, 40, 195.
- KING, R.J.B., GORDON, J. and STEGGLES, A.W. (1969) : The Properties of a Nuclear Acidic Protein Fraction that Binds (6,7-³H) Oestradiol-17 β . *Biochem. J.*, 114, 649.
- KIRTLEY, M.E. and KOSHLAND, D.E. Jr. (1967) : Models for Cooperative Effects in Proteins Containing Subunits. *J. Biol. Chem.*, 242, 4192.
- KLOTZ, I.M. (1953) : Protein Interactions. In : *The Proteins*. H. Neurath and K. Bailey, eds. Academic Press, N.Y., Vol. 1, part. B., 727.
- KOCH, B., MIALHE-VOLOSS, C. et STUTINSKY, E. (1968a) : Capacité de liaison de la Transcortine et réponse à l'agression pendant la période post-natale chez le Rat. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 266, 808.
- KOCH, B., MIALHE-VOLOSS, C., LUTZ, B. et STUTINSKY, F. (1968b) : Absence d'effet de la thyroxine sur le nombre de sites de transcortine en fin de gestation chez la Ratte. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 267, 1315.
- KOLANOWSKI, J. and PIZARRO, M.A. (1969) : Critical Evaluation of Competitive Protein-Binding Radioassay for Cortisol. *Ann. Endocrinol.*, 30, 177.
- KORENMAN, S.G. (1968a) : Radio-Ligand Binding Assay of Specific Estrogens Using a Soluble Uterine Macromolecule. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 28, 127.
- KORENMAN, S.G. and RAO, B.R. (1968b) : Reversible Disaggregation of the Cytosol-Estrogen Binding Protein of Uterine Cytosol. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 61, 1028.
- KORENMAN, S.G. (1969) : Comparative Binding Affinity of Estrogens and its Relation to Estrogenic Potency. *Steroids*, 13, 163.
- KOSHLAND, D.E., NEMETHY, G. and FILMER, D. (1966) : Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits. *Biochemistry*, 5, 365.
- LABRIE, F., RAYNAUD, J.P. and FORTIER, C. (1964) : Relative Binding of Corticosterone by Transcortin and Albumin as a Function of Total Plasma Corticosterone Concentration. *Feder. Proc.*, 23, 357.
- LABRIE, F., NORMAND, M., RAYNAUD, J.P. and FORTIER, C. (1965) : Two Methods for Determining the Corticosterone Binding Characteristics of Transcortin. *Proc. Canad. Feder. Biol. Soc.*, 8, 40.
- LABRIE, F. (1967) : Interactions hormonales et rôles de la transcortine dans l'ajustement de l'activité hypophysosurrénalienne. Thèse de Doctorat ès Sciences. Univ. Laval. Québec.
- LABRIE, F., PELLETIER, G., RAYNAUD, J.P., DUCOMMUN, P. et FORTIER, C. (1969) : Liaison Transcortine-Corticostéroïdes et interactions hypophyso-thyroïdo-surrénales. Dans : *Métabolisme périphérique et transport humoral des hormones thyroïdiennes et stéroïdes*. Colloque d'endocrinologie Xre réunion des endocrinologistes du Québec français. Deane et Masson, eds. Paris, 115.

LAUSON, H.D., HELLER, C.G., GOLDEN, J.B. and SEVERINGHAUS, E.L. (1939) : The Immature Rat Uterus in the Assay of Estrogenic Substance and a Comparison of Estradiol, Estrone and Estriol. *Endocrinology*, 24, 35.

LAVIETES, P.H. (1937) : Anaerobic Ultrafiltration. *J. Biol. Chem.*, 126, 267.

LEBEAU, M.C., MERCIER-BODARD, C., OLDS, J., BOURQUIN, D., BRECY, T., RAYNAUD, J.P. and BAULIEU, E.E. (1969) : Mesure de la liaison de la corticostérone, du sulfate de corticostérone, de la testérone et de l'oestradiol à des protéines du plasma. *Ann. Endocrinol.*, 30, 183.

LEBEAU, M.C. and BAULIEU, E.E. (1970) : Binding of Steroid Conjugates to Human Corticosteroid Binding Globulin. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 30, 166.

LINEWEAVER, H. and BURK, D. (1934) : The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Amer. Chem. Soc.*, 56, 658.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951) : Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265.

MCGUIRE, J.L. and LISK, R.D. (1969) : Localization of Estrogen Receptors in the Rat Hypothalamus. *Neuro-endocrinol.*, 4, 289.

MACKAY, D. (1966) : The Mathematics of Drug-Receptor Interactions. *J. Pharm. Pharmacol.*, 18, 201.

MAEDA, R., OKAMOTO, M., WEGIENKA, L.C. and FORSHAM, P.H. (1969) : A Clinically Useful Method for Plasma Testosterone Determination. *Steroids*, 13, 83.

MAINWARING, W.I.P. (1969) : The Binding of (1,2-³H) Testosterone within Nuclei of the Rat Prostate. *J. Endocrinol.*, 44, 323.

MAURER, H.R. and CHALKLEY, G.R. (1967) : Some Properties of a Nuclear Binding Site of Estradiol. *J. Mol. Biol.*, 27, 431.

MAUTNER, H.G. (1967) : The Molecular Basis of Drug Action. *Pharmacol. Rev.*, 19, 107.

MAYES, D. and NUGENT, C.A. (1968) : Determination of Plasma Testosterone by the Use of Competitive Protein Binding. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 28, 1169.

MERCIER, C., ALFSEN, A. and BAULIEU, E.E. (1966a) : A Testosterone Binding Globulin. In : *Sec. Symp. On Steroid Hormones*, GHENT, 1965, *Excerpta Med. International Congress Series*, 101, 212

MERCIER, C. (1966b) : Specificity of a Plasma Testosterone-Binding Globulin. In : *Sec. Int. Congr. on Hormonal Steroids*, MILAN, 1966, *Excerpta Med. International Congress Series*, 111, 269.

MERCIER, C., ALFSEN, A. et BAULIEU, E.E. (1967) : Proteines liant la testostérone dans le sérum de femme enceinte. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 264, 122.

MERCIER-BODARD, C. et BAULIEU, E.E. (1968a) : Affinité pour l'oestradiol de la protéine plasmatique de liaison de la testostérone. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 267, 804.

MERCIER, C. et BAULIEU, E.E. (1968b) : Récentes études des protéines plasmatiques liant la testostérone. *Ann. Endocrinol.*, 29, 159.

MERCIER-BODARD, C., ALFSEN, A. and BAULIEU, E.E. (1970) : Steroid Binding Plasma Protein (S.B.P.). In : *Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology. 2nd Symposium : Steroid Assay by Protein Binding*. E. Diczfalussy, Ed. *Acta Endocrinol. Suppl.* 147, 204.

- MEYER, M.C. and GUTTMAN, D.E. (1968) : The Binding of Drugs by Plasma Proteins. *J. Pharm. Sci.*, 57, 895.
- MILGROM, E. and BAULIEU, E.E. (1969) : A Method for Studying Binding Proteins, Based upon Differential Dissociation of Small Ligand. *Biochem. Biophys. Acta*, 194, 602.
- MILLS, I.M. and BARTTER, F.C. (1959) : The Effect of Oestrogen Administration on the Protein Binding and Metabolism of Hydrocortisone. *J. Endocrinol.*, 18, V.
- MILLS, I.H., SCHEDL, H.P., CHEN, P.S., Jr. and BARTTER, F.C. (1960) : The Effect of Estrogen Administration on the Metabolism and Protein Binding of Hydrocortisone. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 20, 515.
- MILLS, I.H. (1962) : Transport and Metabolism of Steroids. *Brit. Med. Bull.*, 18, 127.
- MONOD, J., WYMAN, J. and CHANGEUX, J.P. (1965) : On the Nature of Allosteric Transitions : A Plausible Model. *J. Mol. Biol.*, 12, 88.
- MUELLER, G.C., GORSKI, J. and AIZAWA, Y. (1963) : The Role of Protein Synthesis in Early Estrogen Action. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 50, 164.
- MULDOON, T.G. and WESTPHAL, U. (1967) : Steroid-Protein Interactions XV. Isolation and Characterization of Corticosteroid-Binding Globulin from Human Plasma. *J. Biol. Chem.*, 242, 5636.
- MURPHY, B.E.P., ENGELBERG, W. and PATTEE, C.J. (1963) : Simple Method for the Determination of Plasma Corticoids. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 23, 293.
- MURPHY, B.E.P., (1964a) : Application of the Property of Protein-Binding to the Assay of Minute Quantities of Hormones and Other Substances. *Nature*, 201, 679.
- MURPHY, B.E.P. and PATTEE, C.J. (1964b) : Determination of Plasma Corticoids by Competitive Protein-Binding Analysis Using Gel Filtration. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 24, 919.
- MURPHY, B.E.P. (1967) : Some Studies of the Protein-Binding of Steroids and their Application to the Routine Micro and Ultramicro Measurement of Various Steroids in Body Fluids by Competitive Protein-Binding Radioassay. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 27, 973.
- MURPHY, B.E.P. (1968) : Clinical Evaluation of Urinary Cortisol Determinations by Competitive Protein-Binding Radioassay. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 28, 343.
- MURPHY, B.E.P. (1969) : Protein Binding and the Assay of Nonantigenic Hormones. *Rec. Progr. Horm. Res.*, 25, 563.
- NEILL, J.D., JOHANSSON, E.D.B., DATTA, J.K. and KNOBIL, E. (1967) : Relationship between the Plasma Levels of Luteinizing Hormone and Progesterone during the Normal Menstrual Cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 27, 1167.
- NELSON, D.H., TANNEY, H., ESTMAN, G., GIESCHEN, V.W. and WILSON, L.D. (1963) : Potentiation of the Biologic Effect of Administered Cortisol by Estrogen Treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 23, 261.
- NOTEBOOM, W.D. and GORSKI, J. (1963) : An Early Effect of Estrogen on Protein Synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 50, 250.
- NOTEBOOM, W.D. and GORSKI, J. (1965) : Stereospecific Binding of Estrogens in the Rat Uterus. *Arch. Biochem. Biophys.*, 111, 559.

- NOTIDES, A. and GORSKI, J. (1966) : Estrogen-induced Synthesis of a Specific Uterine Protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 56, 230.
- NUGENT, C.A. and MAYES, D.M. (1966) : Plasma Cortico-steroids Determined by Use of Corticosteroid-Binding Globulin and Dextran-Coated Charcoal. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 26, 1116.
- NUNEZ, E.A. (1968) : Fixation in vivo du sulfate de 3-Oestradiol - 17β 6,7³H ou de ses métabolites chez la Rate immature. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50, 1983.
- OHTSUKA, E. and KOIDE, S.S. (1968) : Binding of Cortisol and 21-Dehydrocortisol with Transcortin. *Endocrinology*, 83, 999.
- OSORIO, C. and SCHATS, D.L. (1964) : Determination of the Binding Capacity of Corticosteroid-Binding Globulin by Paper Electrophoresis. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 24, 1067.
- OYAKAWA, E.K. and LEVEDAHL, B.H. (1958) : Testosterone Binding to Bovine and Human Serum Albumin : The Role of Tyrosine Groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 74, 17.
- PEARLMAN, W.H. (1964) : The Metabolism and Localization in Tissues of Tritium-Labeled Steroid Sex Hormones. *Hormonal Steroids*, 1, 115.
- PEARLMAN, W.H. and CREPY, O. (1966) : Steroid-Protein Interaction with Particular Reference to Testosterone-Binding by Human Serum. In : *Sec. Int. Congr. on Hormonal Steroids, MILAN, 1966, Excerpta Med. International Congress Series*, 111, 46.
- PEARLMAN, W.H. and CREPY, O. (1967a) : Steroid-Protein Interaction with Particular Reference to Testosterone Binding by Human Serum. *J. Biol. Chem.*, 242, 182.
- PEARLMAN, W.H., CREPY, O. and MURPHY, M. (1967b) : Testosterone-Binding Levels in the Serum of Women during the Normal Menstrual Cycle, Pregnancy, and the Post-Partum Period. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 27, 1012.
- PEARLMAN, W.H., FONG, I.F.F. and TOU, J.S.H. (1969) : A Further Study of a Testosterone-Binding Component of Human Pregnancy Serum. *J. Biol. Chem.*, 244, 1373.
- PEARLMAN, W.H. (1970) : Measurement of Testosterone Binding Sites. In : *Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology. 2nd Symposium : Steroid Assay by Protein Binding. E. Diczfalusy, Ed. Acta Endocrinol. Suppl.* 147, 225.
- PEARSON, J., KEANE, P.M. and WALKER, W.H.C. (1967) : Binding of Cortisol to Human Albumin. *Nature*, 216, 1334.
- PETERSON, R.E. (1959) : The Miscible Pool and Turnover Rate of Adrenocortical Steroids in Man. *Rec. Progr. Horm. Res.*, 15, 231.
- PETERSON, R.E., NOKES, G., CHEN, P.S. Jr. and BLACK, R.L. (1960) : Oestrogens and Adrenocortical Function in Man. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 20, 495.
- PETERSON, R.P. and SPAZIANI, E. (1969) : Cycloheximide and Cortisol Inhibition of Estradiol-Stimulated Uterine Uptake and Distribution of Homologous Serum Albumin and alpha Globulin in the Rat. *Endocrinology*, 85, 932.
- PFAFF, D.W. (1968) : Uptake of ³H-Estradiol by the Female Rat Brain. An Autoradiographic Study. *Endocrinology*, 82, 1149.

- PLAGER, J.E., KNOPP, R., SLAUNWHITE, W.R. Jr. and SANDBERG, A.A. (1963) : Cortisol Binding by Dog Plasma. *Endocrinology*, 73, 353.
- PLAGER, J.E., SCHMIDT, K.G. and STAUBITZ, W.J. (1964) : Increased Unbound Cortisol in the Plasma of Estrogen-Treated Subjects. *J. Clin. Invest.*, 43, 1066.
- PLAGER, J.E. (1965) : The Binding of Androsterone Sulfate, Etiocholanolone Sulfate, and Dehydroisoandrosterone Sulfate by Human Plasma Protein. *J. Clin. Invest.* 44, 1234.
- POLLARD, I. and MARTIN, L. (1967) : The Rate of Uptake of Locally Applied Oestradiol and Oestrone by the Vaginal Epithelium of the Ovariectomized Mouse. *J. Endocrinol.*, 38, 71.
- PRESL, J., ROHLING, S., HORSKY, J. and HERZMANN, J. (1970) : Changes in Uptake of ³H-Estradiol by the Female Rat Brain and Pituitary from Birth to Sexual Maturity. *Endocrinology*, 86, 899.
- PUCA, G.A. and BRESCIANI, F. (1968) : Receptor Molecule for Oestrogens from Rat Uterus. *Nature*, 218, 967.
- PUCA, G.A. and BRESCIANI, F. (1969) : Association Constant and Specificity of Oestradiol-Receptor Interaction. *Nature*, 223, 745.
- QUINCEY, R.V. and GRAY, C.H. (1963) : A Comparison of Protein-Binding of Cortisol as Measured by Equilibrium Dialysis and Gel Filtration. *J. Endocrinol.*, 26, 509.
- RAY, A., REYNOLDS, J.A., POLET, H. and STEINHARDT, J. (1966) : Binding of Large Organic Anions and Neutral Molecules by Native Bovine Serum Albumin. *Biochemistry*, 5, 2606.
- RAYNAUD, J.P., LABRIE, F. and FORTIER, C. (1964) : Relative Binding of Corticosterone by Transcortin and Albumin, as determined by Gel-Filtration and Equilibrium Dialysis. *Proc. Canad. Feder. Biol. Soc.*, 7, 44.
- RAYNAUD, J.P., FABRE-JUNG, I. and BAULIEU, E.E. (1967) : Metabolic Properties of some Testosterone Derivatives as Determined by Dynamic Studies. Digest of the 7th International conference on medical and biological engineering. STOCKHOLM, 1967, 483.
- RAYNAUD, J.P. (1969) : A Model for the Mode of Action of Estrogenic Compounds. In : Fourth Int. Congr. on Pharmacology. BALE, 1969, Abstracts, p. 451.
- RAYNAUD, J.P. (1970a) : A "Proportion Graph" Method for Measuring Binding Systems. In : Frontiers of Nuclear Medicine, Horst, ed. Springer-Verlag. (sous presse)
- RAYNAUD, J.P., AZADIAN-BOULANGER, G., BOURQUIN, D. et PHILIBERT, D. (1970b) : Réalisation d'un modèle pharmacodynamique pour l'étude du mode d'action des estrogènes au moyen de composés radioactifs. Symposium sur les progrès des techniques nucléaires en pharmacodynamie. SACLAY, 1970, G. Valette et Y. Cohen, eds., Masson, Paris, 39.
- RAYNAUD, J.P. (1970c) : Metabolism of Contraceptive Steroids in Man. In : Third Int. Congr. on Hormonal Steroids, HAMBOURG, 1970, Excerpta Med. International Congress Series, 210, 63.
- RAYNAUD-JAMMET, C. et BAULIEU, E.E. (1969) : Action de l'oestradiol in vitro : augmentation de la biosynthèse d'acide ribonucléique dans les noyaux utérins. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, 268, 3211.
- REEVES, B.D., DE SOUZA, M.L.A., THOMPSON, I.E. and DICZFALUSY, E. (1970) : An Improved Method for the Assay of Progesterone by Competitive Protein Binding. *Acta Endocrinol.*, 63, 225.
- ROBERTSON, M.E., STIEFEL, M. and LAIDLAW, H.C. (1959) : The Influence of Estrogen on the Secretion, Disposition and Biologic Activity of Cortisol. *J. Clin. Endocrinol.*, 19, 1381.

- ROCHEFORT, H. et BAULIEU, E.E. (1968) : Relations entre les "récepteurs" utérins de l'oestradiol "³H" cytoplasmique, et "³H" cytoplasmique et nucléaire. C.R. Acad. Sci., Paris, 267, 662.
- ROCHEFORT, H. and BAULIEU, E.E. (1969) : New in Vitro Studies of Estradiol Binding in Castrated Rat Uterus. *Endocrinology*, 84, 108.
- RODBARD, D., RAYFORD, P.L., COOPER, J.A. and ROSS, G.T. (1968) : Statistical Quality Control of Radioimmunoassays. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 28, 1412.
- ROSENBAUM, W., CHRISTY, N.P. and KELLY W.G. (1966) : Electrophoretic Evidence for the Presence of an Estrogen-Binding β -Globulin in Human Plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 26, 1399.
- ROSENFELD, R.L., EBERLEIN, W.R. and BONGIOVANNI, A.M. (1969) : Measurement of Plasma Testosterone by Means of Competitive Protein Binding Analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 29, 854.
- ROSENTHAL, H.E. (1967) : A Graphic Method for the Determination and Presentation of Binding Parameters in a Complex System. *Anal. Biochem.*, 20, 525.
- RUBIN, B.L., DORFMAN, A.S., BLACK, L. and DORFMAN, R.I. (1951) : Bioassay of Estrogens Using the Mouse Uterine Response. *Endocrinology*, 49, 429.
- RUDD, B.T., ROSENFELD, R.L., BONGIOVANNI, A.M. and EBERLEIN, W.R. (1969) : The Measurement of Urinary Testosterone Glucuronide by Competitive Protein Binding and Validation by a Double Isotope Derivative Assay. *Steroids*, 13, 227.
- RYAN, M.T. (1968) : Examination of Steroid Protein Interaction by Ultraviolet Difference Spectrophotometry. *Arch. Biochem. Biophys.*, 126, 407.
- SANDBERG, A.A., SLAUNWHITE, W.R., Jr. and ANTONIADES, H.N. (1957) : The Binding of Steroids and Steroid Conjugates to Human Plasma Proteins. *Rec. Progr. Horm. Res.*, 13, 209.
- SANDBERG, A.A. and SLAUNWHITE, W.R. Jr. (1959) : Transcortin : a Corticosteroid-Binding Protein of Plasma. Level in Various Conditions and the Effects of Estrogens. *J. Clin. Invest.*, 38, 1290.
- SANDBERG, A.A., SLAUNWHITE, W.R. Jr. and CARTER, A.C. (1960) : Transcortin : A Corticosteroid-Binding Protein of Plasma. III. The Effects of Various Steroids. *J. Clin. Invest.*, 39, 1914.
- SANDBERG, A.A., ROSENTHAL, H., SCHNEIDER, S.L. and SLAUNWHITE, W.R. Jr. (1966) : Protein-Steroid Interactions and their Role in the Transport and Metabolism of Steroids. In : *Steroid Dynamics*. G. Pincus, T. Nakao and J.F. Tait, eds., Academic Press, N.Y., 1.
- SANGER, S. (1968) : The Uptake of ¹⁷ β -Oestradiol in Breast Tissue of Female Rats. *Acta Endocrinol.*, 58, 49.
- SAYERS, G. and SAYERS, M.A. (1948) : The Pituitary-Adrenal System. *Rec. Progr. Horm. Res.*, 2, 81.
- SCATCHARD, G. (1949) : The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51, 660.
- SCHATZ, D.L. and OSORIO, C. (1963) : Determination of the Binding Capacity of Corticosteroid Binding Protein. *J. Endocrinol.*, 27, 6.
- SCHILLMAN, J.A., LUMRY, R. and SAMUELS, L.T. (1954) : The Binding of Uncharged Molecules to Proteins. II. Testosterone and Bovine Serum Albumin. *J. Amer. Chem. Soc.*, 76, 2808.

SCHERAGA, H.A. (1961) : In : Protein Structure. Academic Press, N.Y., 217.

Von SCHOLTAN, W., SCHLOSSMANN, K. und ROSENKRANZ, H. (1968) : Die Bindung von Steroidhormonen und v Steroidguanyl-hydrazonen an Serumalbumin. *Arzneim. Forsch.*, 7, 767.

SEAL, U.S. and DOE, R.P. (1962a) : Purification and Properties of Transcortin, the Cortisol-Binding Globulin from Patients with Cancer of the Prostate. *Cancer Chemotherapy Reports*, 16, 329.

SEAL, U.S. and DOE, R.P. (1962b) : Corticosteroid-Binding Globulin. I. Isolation from Plasma of Diethylstilbestrol-Treated Men. *J. Biol. Chem.*, 237, 3116.

SEAL, U.S. and DOE, R.P. (1963) : Corticosteroid-Binding Globulin : Species Distribution and Small-Scale Purification. *Endocrinology*, 73, 371.

SEAL, U.S. and DOE, R.P. (1966) : Corticosteroid-Binding Globulin : Biochemistry, Physiology, and Phylogeny. in : Steroid Dynamics. G. Pincus, T. Nakao and J.F. Tait, eds., Academic Press, N.Y., 63.

SCHUTT, D.A. (1969) : Measurement of Estradiol-17 β in plasma by Competitive Protein-Binding Radioassay. *Steroids*, 13, 69.

SHYAMALA, G. and GORSKI, J. (1969) : Estrogen Receptors in the Rat Uterus. *J. Biol. Chem.*, 244, 1097.

SLAUNWHITE, W.R.Jr. and SANDBERG, A.A. (1959) : Transcortin : A Corticosteroid-Binding Protein of Plasma. *J. Clin. Invest.*, 38, 384.

SLAUNWHITE, W.R. Jr., ROSENTHAL, H. and SANDBERG, A.A. (1963) : Interactions of Steroids with Human Plasma Proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 486.

SLAUNWHITE, W.R. Jr., SCHNEIDER, S., WISSLER, F.C. and SANDBERG, A.A. (1966) : Transcortin. A Corticosteroid-Binding Protein of Plasma. IX. Isolation and Characterization. *Biochemistry*, 5, 3527.

SNART, R.S. (1969) : Method for the Determination of Binding Capacity and Endogenous Concentrations of Steroids. *Biochem. J.*, 111, 254.

STEENO, O., HEYNS, W., Van BAELEN, H. and DE MOOR, P. (1968) : Testosterone Binding in Human Plasma. *Ann. Endocrinol.*, 29, 141.

STEINER, R.F., ROTH, J. and ROBBINS, J. (1966) : The Binding of Thyroxine by Serum Albumin as Measured by Fluorescence Quenching. *J. Biol. Chem.*, 241, 560.

STEINETZ, B.G., MELI, A., GIANNINA, T., BEACH, V.L. and MANNING, J.P., (1967) : Distribution of Radioactivity in Body Fat and Organs of Rats Treated with Labeled Quinestrol, Ethynylestradiol or 17 β -Estradiol. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 124, 111.

STONE, G.M., BAGGET, B. and DONNELLY, R.B. (1963a) : The Uptake of Tritiated Oestrogens by Various Organs of the Ovariectomized Mouse Following Intravenous Administration. *J. Endocrinol.*, 27, 271.

STONE, G.M. (1963b) : The Uptake of Tritiated Oestrogens by Various Organs of the Ovariectomized Mouse Following Subcutaneous Administration. *J. Endocrinol.*, 27, 281.

STONE, G.M. and MARTIN, L. (1964) : The Uptake of Tritiated Oestradiol and Oestrone by the Uterus of the Ovariectomized Mouse Following Local Application. *Steroids*, 5, 699.

STONE, G.M. and BAGGET, B. (1965a) : The Effect of Some Anti-Metabolites on the Uptake of Tritiated Estradiol by the Vagina of the Ovariectomized Mouse. *Steroids*, 5, 495.

- STONE, G.M. and BAGGET, B. (1965b) : The Uptake of Some Tritiated Estrogenic and Non-Estrogenic Steroids by the Mouse Uterus and Vagina in Vivo and in Vitro. *Steroids*, 6, 277.
- STUMPF, W.E. (1968) : Subcellular Distribution of ^3H -Estradiol in Rat Uterus by Quantitative Autoradiography. A Comparison Between ^3H -Estradiol and ^3H -Norethynodrel. *Endocrinology*, 83, 777.
- STUMPF, W.E. (1969) : Nuclear Concentration of ^3H -Estradiol in Target Tissues. Dry-Mount Autoradiography of Vagina Oviduct, Ovary, Testis, Mammary Tumor, Liver and Adrenal. *Endocrinology*, 85, 31.
- TAIT, J.F. and BURSTEIN, S. (1964) : In Vivo Studies of Steroid Dynamic in Man. In : *The Hormones*. G. Pincus, K.V. Thimann and E.B. Astwood, eds., Academic Press, N.Y., 5, 441.
- TALIAFERRO, I., COBEY, F. and LEONE, L. (1956) : Effect of Diethylstilbestrol on Plasma 17-Hydroxycorticosteroid Levels in Humans. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 92, 742.
- TALWAR, G.P., SEGAL, S.J., EVANS, A. and DAVIDSON, O.W. (1964) : The Binding of Estradiol in the Uterus : a Mechanism for Derepression of RNA synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 52, 1059.
- TALWAR, G.P., SOPORI, M.L., BISWAS, D.K. and SEGAL, S.J. (1968) : Nature and Characteristics of the Binding of Oestradiol -17 β -to a Uterine Macromolecular Fraction. *Biochem. J.*, 107, 765.
- TAVERNETTI, R.R., ROSENBAUM, W., KELLY, W.G., CHRISTY, N.P. and ROGINSKY, M.S. (1967) : Evidence for the Presence in Human Plasma of an Estrogen-Binding Factor Other than Albumin : Abnormal Binding of Estradiol in Men with Hepatic Cirrhosis. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 27, 920.
- TERENIUS, L. (1965) : Uptake of Radioactive Oestradiol in Some Organs of Immature Mice. *Acta Endocrinol.*, 50, 584.
- TERENIUS, L. (1966) : Specific Uptake of Oestrogens by the Mouse Uterus in Vitro. *Acta Endocrinol.*, 53, 611.
- TERENIUS, L. (1968a) : Structural Characteristics of Oestrogen Binding in the Mouse Uterus : Inhibition of 17 β Oestradiol Binding in Vitro by a Plant Oestrogen, Miroestrol. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 26, 15.
- TERENIUS, L. (1968b) : Oestrogen Binding in the Mouse Uterus. *Acta Endocrinol.*, 57, 669.
- TOFT, D., SHYAMALA, G. and GORSKI, J. (1967) : A Receptor Molecule for Estrogens : Studies Using a Cell-Free System. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 57, 1740.
- TORIBARA, T.Y., TEREPKA, A.R. and DEWEY, P.A. (1957) : The Ultrafiltrable Calcium of Human Serum. I. Ultrafiltration Methods and Normal Values. *J. Clin. Invest.*, 36, 738.
- UI, H. and MUELLER, G.C. (1963) : The Role of RNA Synthesis in Early Estrogen Action. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 50, 256.
- UPTON, G.V. and BONDY, P.K. (1958) : The Binding of Cortisol by Plasma Protein. *Arch. Biochem. Biophys.*, 78, 197.
- Van BAELEN, H., HEYNS, W., SCHONNE, E. and DE MOOR, P. (1968) : An Estradiol Binding Globulin in Human Serum : Partial Purification. *Ann. Endocrinol.*, 29, 153.
- Van ROSSUM, J.M. (1966) : Limitations of Molecular Pharmacology. Some Implications of the Basic Assumptions Underlying Calculations on Drug-Receptor Interactions and the Significance of Biological Drug Parameters. *Adv. Drug. Res.*, 3, 189.

- VERMEULEN, A. and VERDONCK, L. (1968) : Studies on the Binding of Testosterone to Human Plasma. *Steroids*, 11, 609.
- VERMEULEN, A., VERDONCK, L., Van der STRAETEN, M. and ORIE, N. (1969) : Capacity of the Testosterone-binding Globulin in Human Plasma and Influence of Specific Binding of Testosterone on its Metabolic Clearance Rate. *J. Clin. Endocrinol.*, 29, 1470.
- WALLACE, E.Z., SILVERGERG, H.I. and CARTER, A.C. (1957) : Effect of Ethinyl Estradiol on Plasma 17-hydroxycorticosteroids, ACTH Responsiveness and Hydrocortisone Clearance in Man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 95, 805.
- WANG, S.F., KAWAHARA, F.S. and TALALAY, P. (1963) : The Mechanism of the Δ^5 -3-Ketosteroid Isomerase Reaction : Absorption and Fluorescence Spectra of Enzyme-Steroid Complexes. *J. Biol. Chem.*, 238, 576.
- WARREN, J.C. and SALHANICK, H.A. (1960) : Measurement of Cortical Binding Capacity in Human Plasma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 105, 624.
- WAUD, D.R. (1968) : Pharmacological Receptors. *Pharmacological Reviews*, 20, 49.
- WEBER, G. and ANDERSON, R.S. (1965) : Multiplicity of Binding. Range of Validity and Practical Test of Adair's Equation. *Biochemistry*, 4, 1942.
- WEST, C.D., TYLER, F.H. and BROWN, H., (1951) : The Effect of Intravenous Testosterone on Nitrogen and Electrolyte Metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 11, 833.
- WESTPHAL, U., FIRSCHEIN, H.E. and PEARCE, E.M. (1955a) : Binding of Hydrocortisone-4-C¹⁴ and Progesterone 4-C¹⁴ to Serum Albumin, Demonstrated by Paper Electrophoresis. *Science*, 121, 601.
- WESTPHAL, U. (1955b) : Interaction between Hydrocortisone 4-C¹⁴ or Progesterone 4-C¹⁴ and Serum Albumin as Demonstrated by Ultracentrifugation and Electrophoresis. *Endocrinology*, 57, 456.
- WESTPHAL, U. (1957) : Steroid-Protein Interactions. III. Spectrophotometric Demonstration of Interaction between Proteins and Progesterone, Deoxycorticosterone and Cortisol. *Arch. Biochem. Biophys.*, 66, 71.
- WESTPHAL, U. and ASHLEY, B.D. (1958) : Steroid-Protein Interactions. IV. Influence of Functional Groups in Δ^4 -3-Ketosteroids on Interaction with Serum Albumin and β Lacto Globulin. *J. Biol. Chem.*, 233, 57.
- WESTPHAL, U., ASHLEY, B.D. and SELDEN, G.L. (1961a) : Steroid-Protein Interactions. VII. Interactions of Progesterone and Corticosteroids with Human Plasma Proteins Determined by Multiple Equilibrium Dialysis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 92, 441.
- WESTPHAL, U. (1961b) : In : Mechanism of Action of Steroid Hormones. L. Engel and C.A. Villee, eds., Macmillan (Pergamon), N.Y., 33.
- WESTPHAL, U. and ASHLEY, B.D. (1962) : Steroid-Protein Interactions. VIII. Structure of Δ^4 -3-Ketosteroids in Relation to Spectrophotometric Interaction with Human Serum Albumin. *J. Biol. Chem.*, 237, 2763.
- WESTPHAL, U. (1966) : Steroid-Protein Interactions. XII. Distribution of Progesterone and Corticosteroid Hormones Among Serum Proteins. Hoppe-Seylers. *Z. Physiol. Chem.*, 346, 243.
- WESTPHAL, U. (1967) : Steroid-Protein Interactions. XIII. Concentrations and Binding Affinities of Corticosteroid-Binding Globulins in Sera of Man, Monkey, Rat, Rabbit and Guinea Pig. *Arch. Biochem. Biophys.*, 118, 556.

WESTPHAL, U. (1970) : Preparation and Characteristics of Corticosteroid Binding Globulin (CBG, Transcortin). In : Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology. 2nd Symposium : Steroid Assay by Protein Binding. E. Diczfalussy, Ed. Acta Endocrinol. Suppl. 147, 122.

WHALEN, R.E. and LUTTGE, W.G. (1970) : Long-term Retention of Tritiated Estradiol in Brain and Peripheral Tissues of Male and Female Rats. Neuroendocrinology, 6, 255.

WHITEHEAD, E.P. (1965) : A Theory of the Quaternary Structure of Dehydrogenases, Dehydrogenating Complexes, and Other Proteins. J. Theoret. Biol., 8, 276.

WILKINSON, G.N. (1961) : Statistical Estimations in Enzyme Kinetics. Biochem. J., 80, 324.

WOOLEY, D.E., HOLINKA, C.F. and TIMARAS, P.S. (1969) : Changes in ^3H -Estradiol Distribution with Development in the Rat. Endocrinology, 84, 157.

WYMAN, J. Jr. (1964) : Linked Functions and Reciprocal Effects in Hemoglobin : A Second Look. Adv. Prot. Chem., 19, 223.

WYSS, R.H., HEINRICHS, L.W. and HERMANN, W.L. (1968) : Some Species Differences of Uterine Estradiol Receptors. J. Clin. Endocrinol. Metabol., 28, 1227.

YALON, R.S. and BERSON, S.A. (1960) : Immunoassay of Endogenous Plasma Insulin in Man. J. Clin. Invest., 39, 1157.

YATES, E. and URQUHART, J. (1962) : Control of Plasma Concentrations of Adrenocortical Hormones. Physiol. Rev., 42, 359.

YOSHIMI, T. and LIPSETT, M.B. (1968) : The Measurement of Plasma Progesterone. Steroids, 11, 527.

ZIMMERING, P.E., KAHM, I. and LIEBERMAN, S. (1970) : Estradiol and Progesterone Binding to a Fraction of Ovine Endometrial Cytoplasm. Biochemistry, 9, 2498.

APPENDICE 1

TABLEAUX RECAPITULATIFS DE L'UTILISATION DES TECHNIQUES DE MESURE

Les tableaux, pour chaque technique sont composés de quatre colonnes : protéines, stéroïdes, but recherché, auteurs.

1/ Protéines

Les termes Plasma ou Utérus signifient que les solutions protéiques proviennent du plasma (non dilué ou dilué) ou de l'utérus (cytosol). Dans le cas d'une protéine purifiée les abréviations, déjà explicitées, sont utilisées.

2/ Stéroïdes

Les stéroïdes cités sont ceux employés par les auteurs et correspondent aux quatre grands groupes stéroïdes : corticostéroïdes, androgènes, oestrogènes et progestérone. Ils sont en général radioactifs (marqués soit au ^{14}C , soit ^3H).

3/ But recherché

- Technique

La publication traite essentiellement de la mise au point de la technique.

- Paramètres

La technique est utilisée pour déterminer les paramètres de la liaison ; constante d'association intrinsèque, concentration des sites, énergie libre, enthalpie, entropie.

- Dosage

La technique est appliquée aux dosages hormonaux.

- Identification

Le but recherché est l'identification et la caractérisation des systèmes de liaisons spécifiques.

- Index

Les résultats sont présentés sous la forme d'un index de la liaison dont voici les principaux :

- Index C = Affinité Daughaday (1956b)

$$C = \frac{\text{Stéroïde lié}}{\text{Stéroïde libre} \times \text{protéine (g/l)}}$$

- Index 1/P Pearlman et Crepy (1967a)

L'affinité de liaison 1/P correspond à C lorsque stéroïde lié = stéroïde libre, c'est-à-dire pour une liaison de 50 %.

- Index capacité de liaison

Pour Sandberg, Slaunwhite et Carter (1960), la capacité de liaison est inversement reliée à la diminution de la liaison provoquée par l'addition de 1 g de stéroïde. La capacité est définie par Mills (1962) comme la quantité totale de stéroïde qui peut être fixée par la protéine.

- Index C.B.C., C.B.I., C.B.A.

Daughaday et coll, (1962), et De Moor et coll (1962) définissent la capacité de liaison (C.B.C.) comme la quantité de corticostéroïde lié (en g) par 100 ml de plasma ou par gramme de protéine.

L'index de liaison C.B.I. Heyns et coll. (1967) est le produit : constante intrinsèque d'association x concentration des sites de liaison = affinité x capacité.

De Moor et Heyns (1968) calculent l'affinité de la transcortine C.B.A. à partir de la relation

$$C.B.I. = C.B.A. \times C.B.C.$$

- *Index R.B.A.* - *index de liaison relative*

Daughaday, Holloszy et Kozak-Mariz (1961) introduisent la notion de liaison relative en comparant la liaison entre deux solutions protéiques différentes dialysant contre la même solution externe.

- *Index % = index de pourcentage*

Le pourcentage de liaison est l'index le plus couramment utilisé. *Slaunwhite, Rosenthal et Sandberg (1963)* calculent le % lié pour une concentration totale de stéroïde de 10^{-7} M, tandis que certains auteurs font varier cette concentration.

Le choix de ces index par les différents auteurs est critiquable pour plusieurs raisons, et en premier lieu par l'emploi des termes "affinité" ou "capacité de liaison" qui, selon les auteurs, n'ont pas la même signification. D'autre part, certains index, comme C ou l/P, ne sont valables que dans des limites très étroites. D'autres sont imprécis, comme la "capacité de liaison" qui varie avec la concentration de stéroïde initialement présent ou comme C.B.I. qui rend compte seulement d'une constante d'association apparente.

4/ Auteurs

Pour simplifier le tableau, le nom du premier auteur est indiqué avec l'année de la publication. Seuls les principaux auteurs sont mentionnés dans ces tableaux ; différentes revues de la littérature peuvent servir à compléter cette liste. *Sandberg et coll (1957)*, *Daughaday (1959b)*, *Westphal (1961b)*, *Mills (1962)*, *Yates et Urquhart (1962)*, *Tait et Burstein (1964)*, *Sandberg et coll (1966)*, *Guillemant, Thomopoulos et Desgrez (1969)*, *Murphy (1969)*.

DIALYSE A L'EQUILIBRE

BSA	Testostérone	Paramètres	<i>Schellman</i> 1954
Plasma humain	Cortisol	Index C	<i>Daughaday</i> 1956b
Plasma humain	Estrogènes Androgènes Corticostéroïdes Progestérone	Identification	<i>Sandberg</i> 1957
Plasma humain	Corticostéroïdes	Index C	<i>Daughaday</i> 1958a
Plasma humain	Cortisol	Index capacité de liaison	<i>Sandberg</i> 1960
Plasma humain	Cortisol Triamcinolone	Index %	<i>Florini</i> 1961
Albumine Plasma humain	Cortisol	Index capacité de liaison	<i>Nelson</i> 1963
Plasma	Cortisol	Index %	<i>Quincey</i> 1963
Plasma humain fractionné	Corticostéroïdes Androgènes Oestrogènes Progestérone	Index %	<i>Slaunwhite</i> 1963
Plasma humain	Corticostéroïdes	Dosage	<i>Murphy</i> 1963
Plasma chien	Cortisol	Index %	<i>Plager</i> 1963
HSA-BSA	Cortisol	Paramètres	<i>Brunkhorst</i> 1965
Plasma humain	Sulfates de stéroïdes	Index %	<i>Plager</i> 1965
Sérum humain	Corticostéroïdes Progestérone	Paramètres	<i>Westphal</i> 1966

Plasma rat	Corticostérone	Paramètres	<i>Labrie</i> 1967
Plasma humain	Oestradiol	Index %	<i>Tavernetti</i> 1967
Plasma humain	Testostérone Androstenedione Dehydroiso- androsterone	Index %	<i>Forest</i> 1968
Plasma humain CBG - SBP	Testostérone Corticostérone Oestradiol	Paramètres	<i>Baulieu</i> 1969
Plasma rat	Corticostérone	Index CBG	<i>Koch</i> 1968a,b
Plasma humain	Oestrogènes conjugués	Index %	<i>Giorgi</i> 1969
Prostate rat	Testostérone	Identification	<i>Mainwaring</i> 1969
Plasma humain CBG - SBP	Testostérone Corticostérone Oestradiol	Paramètres	<i>Lebeau</i> 1969
Plasma humain	Testostérone	Paramètres	<i>Vermeulen</i> 1969
Plasma rat	Oestrogènes	Paramètres	<i>Raynaud</i> 1970b
Utérus cytosol	Oestradiol Progestérone	Paramètres	<i>Zimmering</i> 1970

ALBUMINE A L'EXTERIEUR

Plasma humain	Cortisol	Paramètres	<i>Slaunwhite</i> 1959
Plasma humain	Cortisol	Paramètres	<i>Booth</i> 1961
Plasma humain	Testostérone	Paramètres	<i>Vermeulen</i> 1968

DIALYSE MULTIPLE

Liquide biologique	Cortisol	Index %	<i>Daughaday 1959a</i>
Plasma humain	Cortisol	Technique	<i>Warren 1960</i>
Plasma humain	Corticostéroïdes Progestérone	Index C	<i>Westphal 1961a</i>
Plasma humain	Cortisol Aldostérone	Index RBA	<i>Daughaday 1961</i>
Plasma humain	Cortisol	Index CBC	<i>Daughaday 1962</i>
Plasma rat	Cortisol	Index C	<i>Gala 1965a,b</i>
Sérum de différentes espèces	Cortisol Corticostérone Progestérone	Paramètres	<i>Westphal 1966-1967</i>
AAG	Progestérone	Paramètres	<i>Ganguly 1967</i>

DIALYSE AVEC SEPHADEX

Sérum humain	Testostérone	Index 1/P	<i>Pearlman 1967b-1969</i>
Sérum humain	Testostérone	Index 1/P	<i>Guerigian 1968</i>
Plasma humain	Testostérone	Index 1/P	<i>August 1969</i>
Plasma humain	Testostérone Oestradiol Cortisol	Index 1/P	<i>Dray 1969a</i>

ADSORPTION COMPETITIVE

Plasma	Cortisol	Technique	<i>Heyns 1967</i>
Plasma	Cortisol	Index C.B.A	<i>De Moor 1968</i>
Plasma	Testostérone	Dosage	<i>Heyns 1969b</i>

ULTRAFILTRATION

Plasma humain	Estrogènes Androgènes Corticostéroïdes Progestérone	Identification	<i>Sandberg</i> 1957
Plasma humain	Cortisol	Identification	<i>Upton</i> 1958
Plasma humain	Cortisol	Index %	<i>Mille</i> 1960
HSA Plasma humain	Corticostéroïdes Testostérone	Index %	<i>Chen</i> 1961
Plasma chien	Cortisol	Index %	<i>Plager</i> 1963
Plasma humain	Cortisol	Index %	<i>Plager</i> 1964
Plasma rat	Cortisol	Paramètres	<i>Keller</i> 1966
HSA	Cortisol	Technique	<i>Pearson</i> 1967
Plasma humain	Testostérone	Index %	<i>Forest</i> 1968
Plasma humain	Cortisol	Paramètres	<i>Goldie</i> 1968

SPECTROPHOTOMETRIE

Albumine	Progestérone Désoxycorticostérone Cortisol	Technique	<i>Westphal</i> 1957
HSA	Δ^4 3 cétostéroïdes	Paramètres	<i>Westphal</i> 1958, 1962
Albumine	Testostérone	Paramètres	<i>Alfsen</i> 1963
Albumine	Testostérone Dérivés androstanes	Technique	<i>Attallah</i> 1968
Albumine	Progestérone Testostérone Corticostéroïdes	Technique	<i>Ryan</i> 1968
HSA	Stéroïdes hormonaux	Paramètres	<i>Scholtan</i> 1968

ELECTROPHORESE

Albumine	Cortisol Progestérone	Technique	<i>Westphal</i> 1955 a
HSA	Cortisol Progestérone	Index %	<i>Westphal</i> 1955 b
Plasma humain Albumine	Corticostéroïdes	Technique	<i>Daughaday</i> 1956 a
Plasma humain	Cortisol Corticostérone Progestérone	Identification	<i>Daughaday</i> 1958a
Sérum humain	Cortisol	Index capacité de liaison	<i>Schatz</i> 1963
Plasma humain	Cortisol	Caractérisation	<i>Seal</i> 1963
Plasma humain	Cortisol	Index capacité de liaison	<i>Osorio</i> 1964

FILTRATION SUR GEL

Plasma humain	Corticostéroïdes	Technique	<i>De Moor</i> 1962
Plasma	Cortisol	Index %	<i>Quincey</i> 1963
Plasma humain	Corticostéroïdes	Index CBC	<i>Doe</i> 1964
Plasma rat	Corticostérone	Paramètres	<i>Labrie</i> 1964
Plasma humain	Corticostéroïdes	Dosage	<i>Murphy</i> 1964b
Plasma humain	Cortisol	Index CBC	<i>De Moor</i> 1966
Plasma femme enceinte 1/50	Testostérone	Dosage	<i>Kato</i> 1968b
CBG Albumine	Cortisol 21 dehydrocortisol	Index %	<i>Ohtsuka</i> 1968
Plasma humain	Testostérone	Paramètres	<i>Vermeulen</i> 1968
Plasma humain	Progestérone	Dosage	<i>Yoshimi</i> 1968
Plasma ovin	Corticostéroïdes	Dosage	<i>Bassett</i> 1969
Utérus de veau (noyau)	Oestradiol	Paramètres	<i>Puca</i> 1969

ADSORBANTS

CHARBON DEXTRAN

Plasma humain	Corticostéroïdes	Technique	<i>Nugent 1966</i>
Utérus	Oestradiol	Dosage	<i>Baulieu 1967b</i>
Plasma femme enceinte	Testostérone	Dosage	<i>Horton 1967</i>
Plasma humain	Corticostéroïdes	Technique	<i>Murphy 1967</i>
Utérus	Oestradiol	Dosage	<i>Korenman 1968a</i>
Plasma humain	Testostérone	Dosage	<i>Rudd 1969</i>
Plasma humain femme enceinte	Testostérone	Dosage	<i>Rosenfield 1969</i>
Plasma	Cortisol Androstanolone	Technique	<i>Milgrom 1969</i>
Utérus	Oestrogènes	Structure Activité	<i>Korenman 1969</i>
Utérus	Oestradiol	Dosage	<i>Shutt 1969</i>
Utérus	Oestradiol	Dosage	<i>Corker 1969</i>

FLORISIL

Plasma humain femme enceinte	Testostérone	Dosage	<i>Hallberg</i> 1968
Plasma humain	Testostérone	Dosage	<i>Frick</i> 1969
Plasma humain femme enceinte	Testostérone	Index TRA	<i>August</i> 1969
Plasma humain	Progestérone	Dosage	<i>Neill</i> 1967
Plasma humain	Progestérone	Dosage	<i>Reeves</i> 1970

TERRE DE FULLER

Plasma humain	Cortisol	Dosage	<i>Murphy</i> 1968
Plasma humain	Cortisol	Dosage	<i>Kolanowski</i> 1969

PRECIPITATION

Plasma	Testostérone	Dosage	<i>Mayes</i> 1968
Plasma	Testostérone	Dosage	<i>Maeda</i> 1969

APPENDICE 2

METHODE DE REGRESSION

Pour un système $S_I + S_{II} + NS$, l'équation de liaison s'écrit

$$(B) = \frac{K_I(N_I)(U)}{1/K_I + (U)} + \frac{K_{II}(N_{II})(U)}{1/K_{II} + (U)} + K_{NS}(N_{NS})(U) \quad (1)$$

Les constantes $C_1 = K_{NS}(N_{NS})$, $C_2 = K_I(N_I) + K_{II}(N_{II})$ et $C_3 = (N_I) + (N_{II})$ sont déterminées graphiquement.

Après substitution, l'équation (1) devient

$$((B) - C_1(U))(K_I + K_{II}) + (U)((B) - C_1(U) - C_3)K_I K_{II} = C_1 + C_2 - \frac{(B)}{(U)}$$

ou $X_1(K_I + K_{II}) + X_2(K_I K_{II}) = X_3.$

Un ensemble d'équations avec pour inconnues $(K_I + K_{II})$ et $(K_I K_{II})$ est obtenu à partir des mesures de (B) et (U) .

Par régression

$$K_I + K_{II} = \frac{\sum X_1 X_3 \sum X_2^2 - \sum X_2 X_3 \sum X_1 X_2}{\sum X_1^2 \sum X_2^2 - \sum (X_1 X_2)^2}$$

$$K_I K_{II} = \frac{\sum X_2 X_3 \sum X_1^2 - \sum X_1 X_3 \sum X_1 X_2}{\sum X_1^2 \sum X_2^2 - \sum (X_1 X_2)^2}$$

K_I et K_{II} sont ainsi racines de l'équation

$$X^2 - (K_I + K_{II})X + (K_I K_{II}) = 0$$

(N_I) et (N_{II}) sont alors calculés.

Pour un système $S_I + S_{II}$, $K_{NS}(N_{NS}) = 0$.

L'équation $(B) (K_I + K_{II}) + (U)((B) - C_3)(K_I K_{II}) = C_2 - \frac{(B)}{(U)}$ est utilisée.

APPENDICE 3

AJUSTEMENTS D'EQUATIONS NON LINEAIRES

Méthode des moindres carrés

Cette méthode est utilisée pour obtenir le meilleur ajustement des points expérimentaux pour un modèle défini par l'équation $y = f(U, \theta, \gamma)$ où y est la variable dépendante, θ, γ les $2n$ paramètres intervenant soit linéairement (θ), soit non linéairement (γ), et U est la variable indépendante. En faisant l'hypothèse que l'erreur expérimentale dans la mesure de la variable dépendante est distribuée normalement, le meilleur ajustement sera celui qui minimise l'expression.

$$\sum_{j=1}^m [y_j - f(U_j, \theta, \gamma)]^2$$

où m est le nombre d'observations.

Pour appliquer la méthode des moindres carrés, le modèle doit être linéarisé par rapport à tous les paramètres. Si le lieu de la solution est approximativement plat, on développera le modèle en série de Taylor, limité au premier terme pour chaque paramètre non linéaire.

$$y = f(U, \theta, \gamma) \approx f(o) + (\gamma - \gamma(o)) \frac{\partial f}{\partial \gamma}(o)$$

soit

$$y = f(U, \theta, \gamma) \approx \sum_{i=1}^n \theta_i(o) \frac{\partial f}{\partial \theta_i}(o) + \sum_{i=1}^n (\gamma_i - \gamma_i(o)) \frac{\partial f}{\partial \gamma_i}(o)$$

soit

$$y = \sum_{i=1}^n \theta_i(o) \frac{\partial f}{\partial \theta_i}(o) + \sum_{i=1}^n (\gamma_i - \gamma_i(o)) \theta_i(o) \frac{\partial^2 f}{\partial \theta_i \partial \gamma_i}(o)$$

(*) Dans le cas présent, l'équation générale s'écrit

$$y = \sum_{i=1}^n \frac{K_i (N_i)}{1 + K_i U} + K_{n+1} \left(N_{n+1} \right)$$

En présence de la constante $K_{n+1} \left(N_{n+1} \right)$, l'analyse est faite sur les variables réduites.

où $\gamma_i(0)$ sont des approximations des paramètres obtenus à partir de méthodes graphiques ou par regression.

En notation matricielle

$$G = A \times X$$

où G est le $(m \times 1)$ vecteur de la réponse observée, A la $(m \times 2n)$ matrice des coefficients et les éléments de X sont les estimées des paramètres.

$$G = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_j \\ y_m \end{bmatrix}_{m \times 1} \quad A = \begin{bmatrix} \frac{\partial f}{\partial \theta_i} & \frac{\partial_2 f}{\partial \theta_i \partial \gamma_i} \end{bmatrix}_{m \times 2n} \quad X = \begin{bmatrix} \theta_i(0) \\ \theta_i(0)(\gamma_i - \gamma_i(0)) \end{bmatrix}_{2n \times 1}$$

Les estimées, par le critère des moindres carrés, de X sont solution de

$$X = (A^t A)^{-1} A^t G$$

Les valeurs trouvées de γ_i sont alors introduites dans une boucle itérative comme $\gamma_i(0)$. Les itérations continuent jusqu'à ce que la série ne diverge pas et s'arrêtent si la diminution de γ_i entre les deux dernières itérations est plus petite qu'une valeur fixée ou si le nombre d'itérations est supérieur à un nombre donné.

Ecart type des paramètres

La précision des paramètres ne peut être obtenue à partir de la méthode graphique. Une étude statistique est nécessaire pour comparer les résultats de plusieurs expériences et tester la validité du modèle *Wilkinson 1961*. La matrice des variances-covariances est $(A^t A)^{-1} \sigma^2$ où σ^2 doit être calculé. Si le modèle est correct, une estimation non biaisée de σ^2 est donnée par S_r^2 , rapport de la somme des carrés des écarts sur le nombre de degrés de libertés : $m - 2n$.

$$S_r^2 = \frac{\sum_{j=1}^m (y_j - \hat{y}_j)^2}{m - 2n}$$

où y_j est la valeur observée de la réponse, $\hat{y}_j$, la valeur calculée, et $(y_j - \hat{y}_j)$, l'écart. Dans le cas d'un modèle correct, les écarts, après ajustement, sont dus uniquement à la déviation expérimentale. L'étude du vecteur écart $(y_j - \hat{y}_j)$ peut servir à tester l'ajustement (Box 1960).

L'écart-type, racine carrée de la variance, fournit une indication sur la précision des paramètres calculés (Cleland 1967).

La variance $S^2(\theta_i)$ des paramètres linéaires θ est la suivante :

$$S^2_{(\theta_i)} = S^2_r \times C_{ii}$$

où C_{ii} est le terme diagonal de la matrice $(A^t A)^{-1}$.

Dans le cas des paramètres non linéaires, on utilise une approximation (Bliss 1966). La variance $S^2(\gamma_i)$ est donnée par :

$$S^2(\gamma_i) = \frac{S^2_r}{\theta_i^2} \left(C_{n+i, n+i} - 2C_{i, n+i} (\gamma_i - \gamma_i(0)) \right)$$

De plus, si la variance de y n'est pas constante pour différentes valeurs de U , on doit faire un ajustement pondéré.

La quantité : $\sum_{j=1}^m w_j (y_j - f(U_j, \theta, \gamma))^2$

sera alors minimisée, w_j étant proportionnel à l'inverse de la variance de y .

$$S^2_r \text{ sera alors : } S^2_r = \frac{\sum_{j=1}^m w_j (y_j - \hat{y}_j)^2}{m-2n}$$

Au sens des moindres carrés, X sera solution de :

$$X = (A^t P A)^{-1} A^t P G$$

où P est une matrice diagonale dans laquelle l'élément W_{jj} est le poids de la j ième observation.

On peut vérifier si le modèle convient, en considérant la variance due à l'erreur expérimentale de chaque point expérimental calculé indépendamment, et comparer, par un test de *Fischer*, cette valeur à celle obtenue par la somme des carrés des écarts. Pour reconnaître s'il y a des paramètres redondants, on recherche si la différence entre la somme des carrés des écarts, entre ce modèle et un/comportant un ou plusieurs paramètres de moins

APPENDICE 4

PROGRAMME DE CALCUL RELATIF A L'ANALYSE DES EXPERIENCES DE LIAISON (B.E.A.)

RESUME

Etant donné m points expérimentaux (y_i, U_i) , la relation entre la variable dépendante y et la variable indépendante U est :

$$y = K_n N_n + \sum_{j=1}^{n-1} \frac{K_j N_j}{1 + K_j U} \quad (1)$$

ou

$$y = \sum_{j=1}^n \frac{K_j N_j}{1 + K_j U} \quad (2)$$

On veut évaluer les paramètres K_j et N_j et leurs variances et déterminer si le modèle choisi convient bien aux valeurs observées.

La fonction (1) a été étudiée pour $n = 2$ (3 paramètres)

$n = 3$ (5 paramètres)

La fonction (2) a été étudiée pour $n = 1$ (2 paramètres)

$n = 2$ (4 paramètres)

La méthode comprend 3 phases :

- la première phase est la détermination graphique des 3 constantes C_1, C_2, C_3 .

$$C_1 = K_3 N_3, C_2 = K_2 N_2 + K_1 N_1, C_3 = N_2 + N_1.$$

La courbe représentant B en fonction de U a une pente à l'origine peu différente de : $(K_1 N_1 + K_2 N_2 + K_3 N_3)$.

Pour les valeurs élevées de U , l'asymptote à la courbe est une ligne droite de pente $K_3 N_3$. L'intersection de cette droite avec l'axe de B a une ordonnée voisine de $(N_1 + N_2)$. Nous avons donc des valeurs approchées de C_1, C_2, C_3 (1).

- La deuxième phase permet, par regression linéaire, d'obtenir des valeurs approchées de $K_1 K_2$ et $K_1 + K_2$. Il est clair que cette phase n'existe pas s'il n'y a que 2 ou 3 paramètres.

- La troisième phase améliore par un calcul itératif les valeurs approchées de K_1 et K_2 .

Les deux dernières phases sont traitées en ordinateur.

I - METHODE DE CALCUL

Considérons la fonction (1) ou $n = 3$ car c'est le cas la plus complet.

Le modèle est :

$$y (= \frac{B}{U}) = K_3 N_3 + \frac{K_2 N_2}{1 + K_2 U} + \frac{K_1 N_1}{1 + K_1 U}$$

1/ Programme BEA (?) (Deuxième phase)

Ce programme lit les données : les valeurs observées (B_i, U_i) pour i variant de 1 à m' et les constantes C_1, C_2, C_3 .

Pour chaque observation, on calcule les coefficients suivants :

$$X_i (1) = B_i - C_1 U_i$$

$$X_i (2) = (B_i - C_1 U_i - C_3) U_i$$

$$X_i (3) = -y_i + C_1 + C_2$$

m' est le nombre de points expérimentaux considérés. Il est conseillé de ne pas prendre en compte tous les points expérimentaux mais seulement ceux qui sont dans le voisinage de l'intersection des deux droites : $B = (C_1 + C_2)U$ et $B = C_1 U + C_3(*)$.

(1) E.E. Baulieu et J.P. Raynaud
Eur. J. Biochem. 13 (1970) 293-304.

(*) $X_i (1)$ manque de précision près de l'origine et $X_i (2)$ pour les valeurs élevées de U . Il vaut donc mieux n'être ni près de l'origine, ni vers les valeurs élevées.

Puis, on calcule les matrices suivantes :

$$A = \begin{bmatrix} \sum_{i=1}^{m'} X_i(1)^2 & \sum_{i=1}^{m'} X_i(1) X_i(2) \\ \sum_{i=1}^{m'} X_i(2) X_i(1) & \sum_{i=1}^{m'} X_i(2)^2 \end{bmatrix} \quad B = \begin{bmatrix} \sum_{i=1}^{m'} X_i(1) X_i(3) \\ \sum_{i=1}^{m'} X_i(2) X_i(3) \end{bmatrix}$$

La matrice V :

$$V = \begin{bmatrix} K_1 + K_2 \\ K_1 \quad K_2 \end{bmatrix}$$

est la solution du système : $A.V = B$

K_1 et K_2 sont alors obtenus par l'intermédiaire de leur somme et de leur produit.

Finalement, on obtient des valeurs approchées pour :

$K_1, K_2, N_1 = (C_2 - C_3 K_2) / (K_1 - K_2), N_2 = C_3 - N_1, K_3 N_3 = C_1$
(Ordinogramme I).

Puis, pour chaque i , on dresse le tableau suivant :

$$U_i, B_i, \hat{B}_i, T_i, \hat{T}_i, \frac{U_i}{T_i}, \frac{U_i}{\hat{T}_i}, \frac{B_i}{T_i}, \frac{\hat{B}_i}{\hat{T}_i}$$

et sur une deuxième ligne les logarithmes de ces valeurs
($\hat{B}_i, \hat{T}_i$ signifient " B_i, T_i calculé").

On calcule la somme des carrés des écarts : $\sum_i (B_i - \hat{B}_i)^2$
(Ordinogramme II).

Puis, on trace une représentation graphique : $\log \frac{B}{T}$
en fonction de $\log T$. Les points expérimentaux sont représentés par le caractère "o", et les points calculés par le caractère "*". Si les deux sont confondus, on les représente par le caractère "+). (Ordinogramme III).

2/ Programme BEA (5) (Troisième phase)

(BEA (4), BEA (3), BEA (2), pour 4, 3, 2 paramètres.).

Ce programme lit les points expérimentaux ($y_i = \frac{B_i}{U_i}$, U_i) et les poids P_i qui leur sont affectés ; les valeurs initiales de $\frac{1}{K_1}$ et $\frac{1}{K_2}$ et leurs indices de précision absolus ϵ_1 et ϵ_2 . La moyenne $\bar{y}$ des valeurs y_i et les valeurs réduites $Y_i = y_i - \bar{y}$ sont calculées. Les meilleures approximations de $\frac{1}{K_1}$ et $\frac{1}{K_2}$ sont calculées par itérations (Ordinogramme IV).

a) A l'intérieur d'une itération :

Les variables auxiliaires suivantes sont calculées pour chaque i variant de 1 à m :

$$\begin{aligned} x(i,1) &= 1/(U_i + 1/K_2) \\ x(i,2) &= 1/(U_i + 1/K_1) \\ x(i,3) &= 1/(U_i + 1/K_2)^2 \\ x(i,4) &= 1/(U_i + 1/K_1)^2 \end{aligned}$$

ainsi que leurs moyenne $\bar{x}(1)$, $\bar{x}(2)$, $\bar{x}(3)$, $\bar{x}(4)$, puis les variables réduites : $X(i,j) = x(i,j) - \bar{x}(j)$ pour i variant de 1 à m et j de 1 à 4.

A partir des matrices suivantes :

$$A^t A = \begin{bmatrix} \sum_{i=1}^m X(i,1)^2 P_i^2 & \sum_{i=1}^m X(i,1)X(i,4) P_i^2 \\ \sum_{i=1}^m X(i,1)X(i,4) P_i^2 & \sum_{i=1}^m X(i,4)^2 P_i^2 \end{bmatrix} \quad \text{et} \quad A^t G = \begin{bmatrix} \sum_{i=1}^m X(i,1) Y_i P_i^2 \\ \sum_{i=1}^m X(i,4) Y_i P_i^2 \end{bmatrix}$$

la matrice inverse $C = (A^t A)^{-1}$ est calculée par une méthode standard dans un sous-programme appelé MATRIX.

Selon le principe du maximum de vraisemblance, la solution est :

$$D = C.A^t G$$

b) L'itération suivante sera démarrée avec :

$$1/K_2 = 1/K_2 \text{ précédent} - D(3) / D(1)$$

$$1/K_1 = 1/K_1 \text{ précédent} - D(4) / D(2)$$

c) Les itérations sont interrompues lorsque :

$$1/K_2 - 1/K_2 \text{ précédent} \leq \epsilon_2$$

$$1/K_1 - 1/K_1 \text{ précédent} \leq \epsilon_1$$

On a alors :

$$N_2 = D(1)$$

$$N_1 = D(2)$$

$$K_3 N_3 = \bar{y} - \sum_{j=1}^4 D(j) \bar{x}(j)$$

(Ordinogramme V)

La somme des carrés des écarts sur les variables réduites est ensuite calculée :

$$S_y^2 = \frac{1}{n-4} \sum_{i=1}^m (Y(i) - \hat{Y}(i))^2$$

Puis les variances des paramètres :

$$S_{N_2}^2 = S_y^2 \cdot C(1,1)$$

$$S_{N_1}^2 = S_y^2 \cdot C(2,2)$$

$$S_{1/K_2}^2 = S_y^2 \cdot (C(3,3) - 2 C(1,3) \cdot D(3)/D(1) / D(1)^2)^{(2)}$$

$$S_{1/K_1}^2 = S_y^2 \cdot (C(4,4) - 2 C(2,4) \cdot D(4)/D(2) / D(2)^2)^{(2)}$$

$$S_{K_3 N_3}^2 = S_y^2 \cdot \left(\frac{1}{m} + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=1}^4 C(i,j) \cdot x(i) \cdot x(j) \right)^{(2)}$$

Une analyse de variance pour déterminer si le modèle convient bien aux points expérimentaux est effectuée.

Varianse résiduelle :

$$S^2 = \frac{1}{m-5} \sum_{i=1}^m (y_i - \hat{y}_i)^2$$

(2) Pour ces approximations, voir "Fitting the rectangular hyperbola" de C.I. Bliss et A.T. James dans la revue

Variance due à la liaison :

$$S_1^2 = \frac{1}{4} \sum_{i=1}^m (\hat{y}_i - \bar{y})^2$$

Variance totale :

$$S_t^2 = \frac{1}{m-1} \sum_{i=1}^m (y_i - \bar{y})^2$$

$$F = \frac{S_1}{S} \quad \text{avec 4 et (m-5) degrés de liberté.}$$

(Ordinogramme VI).

Pour chaque i , on dresse un tableau des quantités déjà énoncées pour le programme BEA (7) (voir l'ordinogramme II). Les seules différences sont que la somme des carrés des écarts est $\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2$ au lieu de $\sum (B_i - \hat{B}_i)^2$ et qu'une analyse de variance est faite ensuite. On trace également la même représentation graphique (voir l'ordinogramme III).

Plusieurs valeurs initiales de $1/K_1$ et $1/K_2$ peuvent être essayées pour le même lot de points expérimentaux.

II - EXEMPLES D'EXECUTIONS

1/ Paramètres d'entrée des deux programmes

codes graphiques	AST	:	caractère "*"
	BLANC	:	caractère blanc
	RØND	:	caractère "o"
	PLUS	:	caractère "+"
	GRAPH 101	:	101 caractères blancs stockés dans un bloc de 101 éléments.

NEXP : numéro d'expérience
 NC : numéro de carte
 N : nombre de points expérimentaux m
 C1 }
 C2 } : constantes C_1, C_2, C_3
 C3 }
 TITRE (20) : titres stockés dans un bloc de 20 éléments
 U (100) : valeurs observées de la variable indépendante stockées dans un bloc de dimension 100.
 B (100) : valeurs observées de la variable dépendante stockées dans un bloc de dimension 100.
 P (100) : valeur des poids stockés dans un bloc de dimension 100.
 ITMAX : nombre maximum d'itérations
 FK1 : $1/K_1$
 FK2 : $1/K_2$
 FE1 : ϵ_1 , indice de précision absolu pour $1/K_1$
 FE2 : ϵ_2 , indice de précision absolu pour $1/K_2$

2/ Paramètres de sortie en impression

N1 : N_1	U : U_i	U/T ØBS : $\frac{U_i}{T_i}$
N2 : N_2	B.ØBS : B_i	U/T CAL : $\frac{U_i}{\hat{T}_i}$
K3N3 : $K_3 N_3$	B.CAL : $\hat{B}_i$	B/T ØBS : $\frac{B_i}{T_i}$
$1/K_1$: $\frac{1}{K_1}$	T.ØBS : T_i	B/T CAL : $\frac{\hat{B}_i}{\hat{T}_i}$
$1/K_2$: $\frac{1}{K_2}$	T.CAL : $\hat{T}_i$	

Les logarithmes de toutes ces quantités sont imprimés juste en dessous.

3/ Exemple d'exécution de BEA (7)

- a) Données (table VII)
- b) Imprimé résultant (table X et XI)

4/ Exemple d'exécution de BEA (5)

- a) Données (table VIII)
- b) Imprimé résultant (table XII et XIII)

5/ Exemple d'exécution de BEA (3)

Cette exécution ne nécessite pas celle de BEA (7). Ce programme est plus communément employé que les autres.

- a) Données (table IX)
- b) Imprimé résultant (table XIV et XV).

III - PRECISIONS SUR LE "HARDWARE" ET LE "SOFTWARE"

Ces programmes sont écrits en FORTRAN 4 pour un système RAX (IBM) connecté à un IBM 360/50 (55K disponibles pour l'utilisateur). L'impression se fait sur une machine à écrire 1052 de 120 colonnes de largeur. L'entrée se fait à partir de cartes perforées. Quelques données ^{sont/} en nombres entiers et les autres sont en flottant.

Le programme symbolique et le programme résultant sont stockés sur disques. Au point de vue taille, le programme BEA(7) occupe 8456 octets et le programme BEA (5), 12740.

Pour les exemples donnés, les temps d'exécution en 360/50 sont :

BEA(7) : 5,9 secondes pour la compilation et 1,6 secondes pour l'exécution

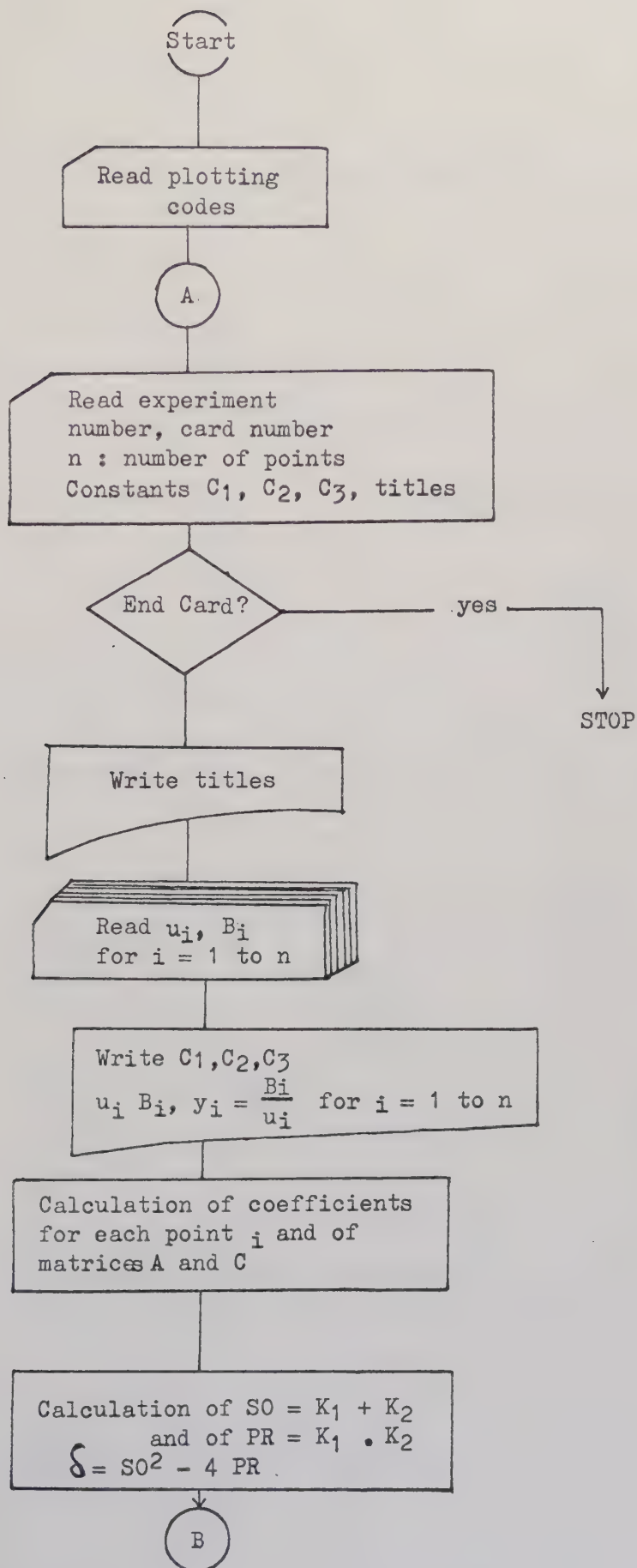
BEA(5) : 9,9 secondes pour la compilation et 2,9 secondes pour l'exécution

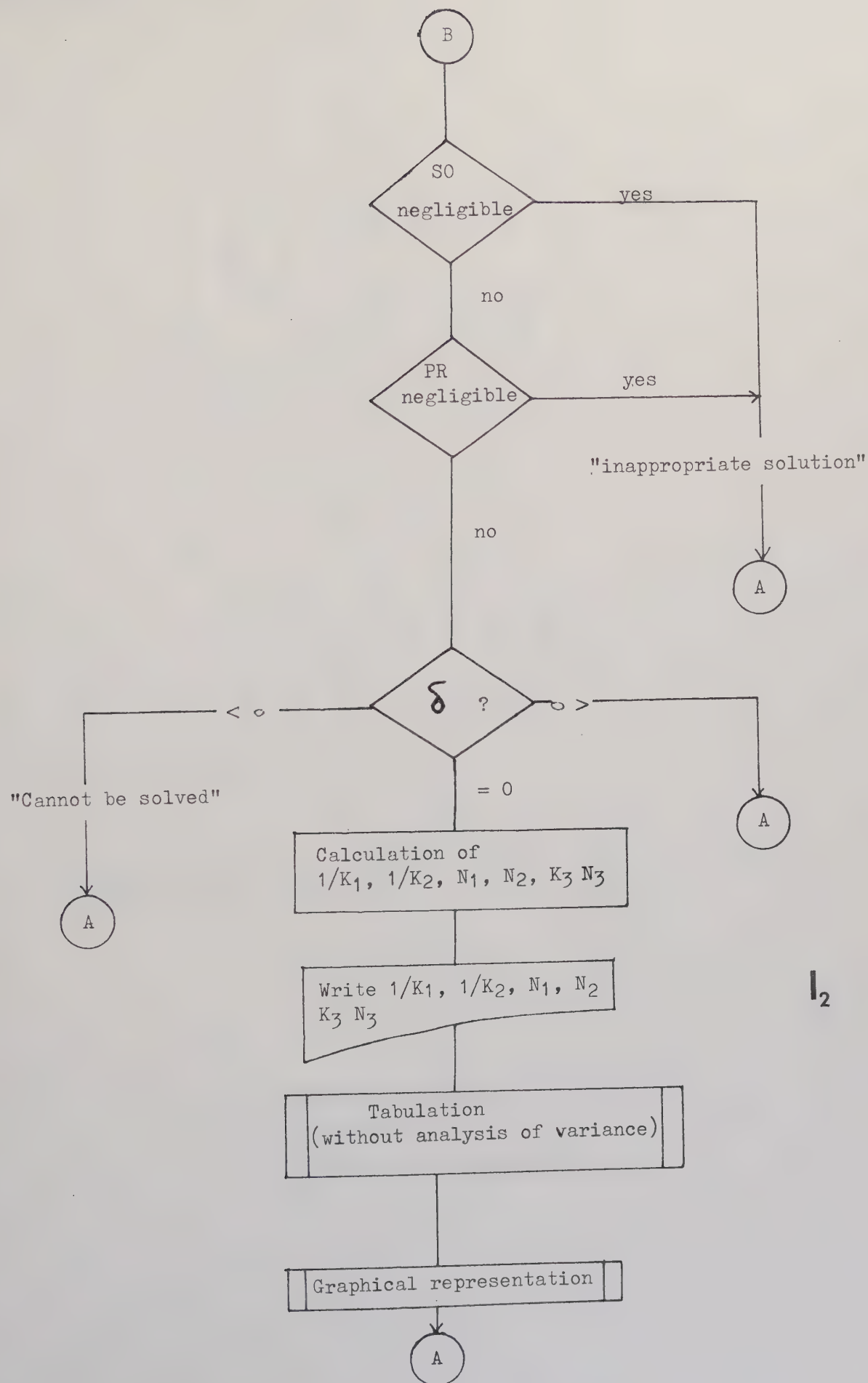
et les temps totaux de connexion sont :

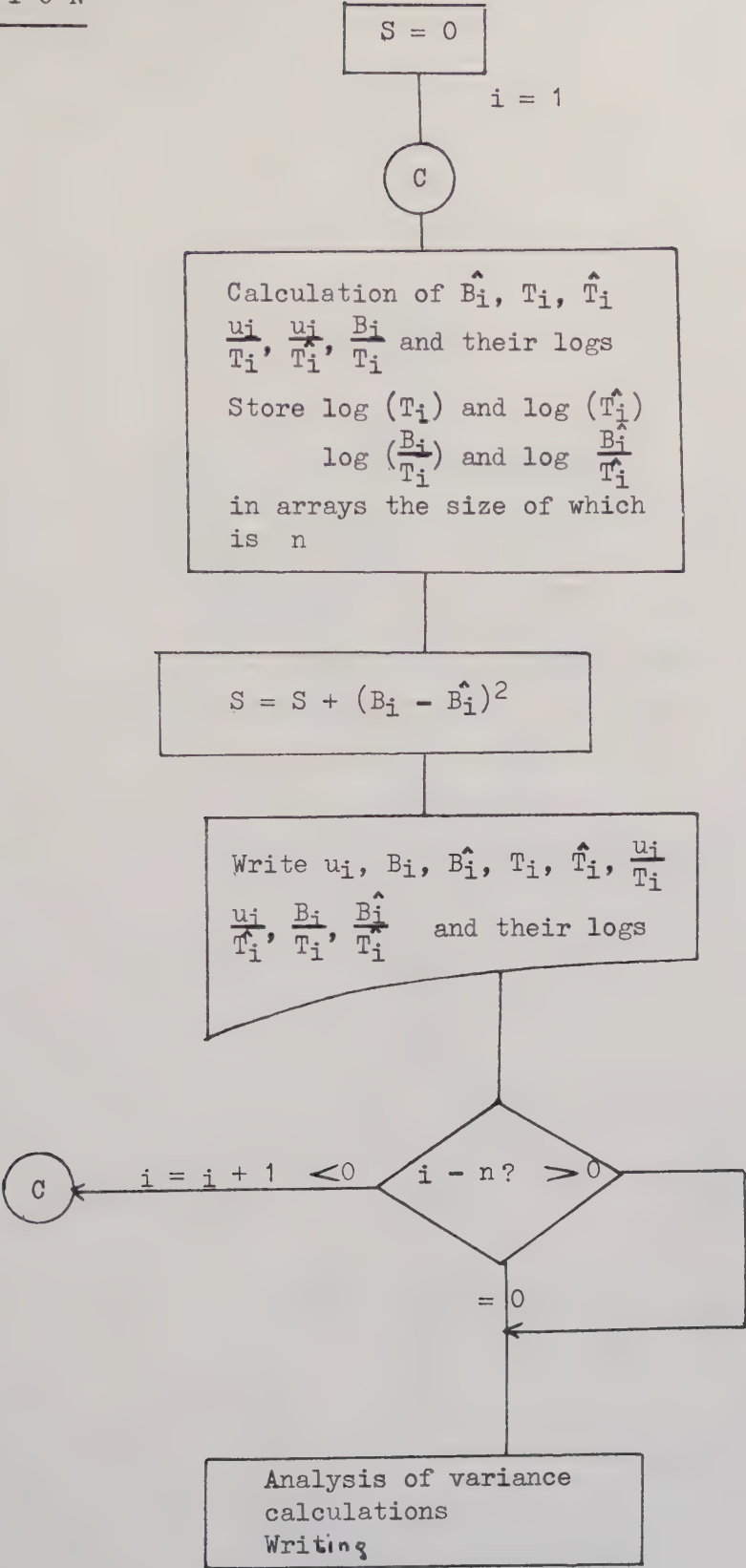
BEA(7) : 7 minutes

BEA(5) : 13 minutes

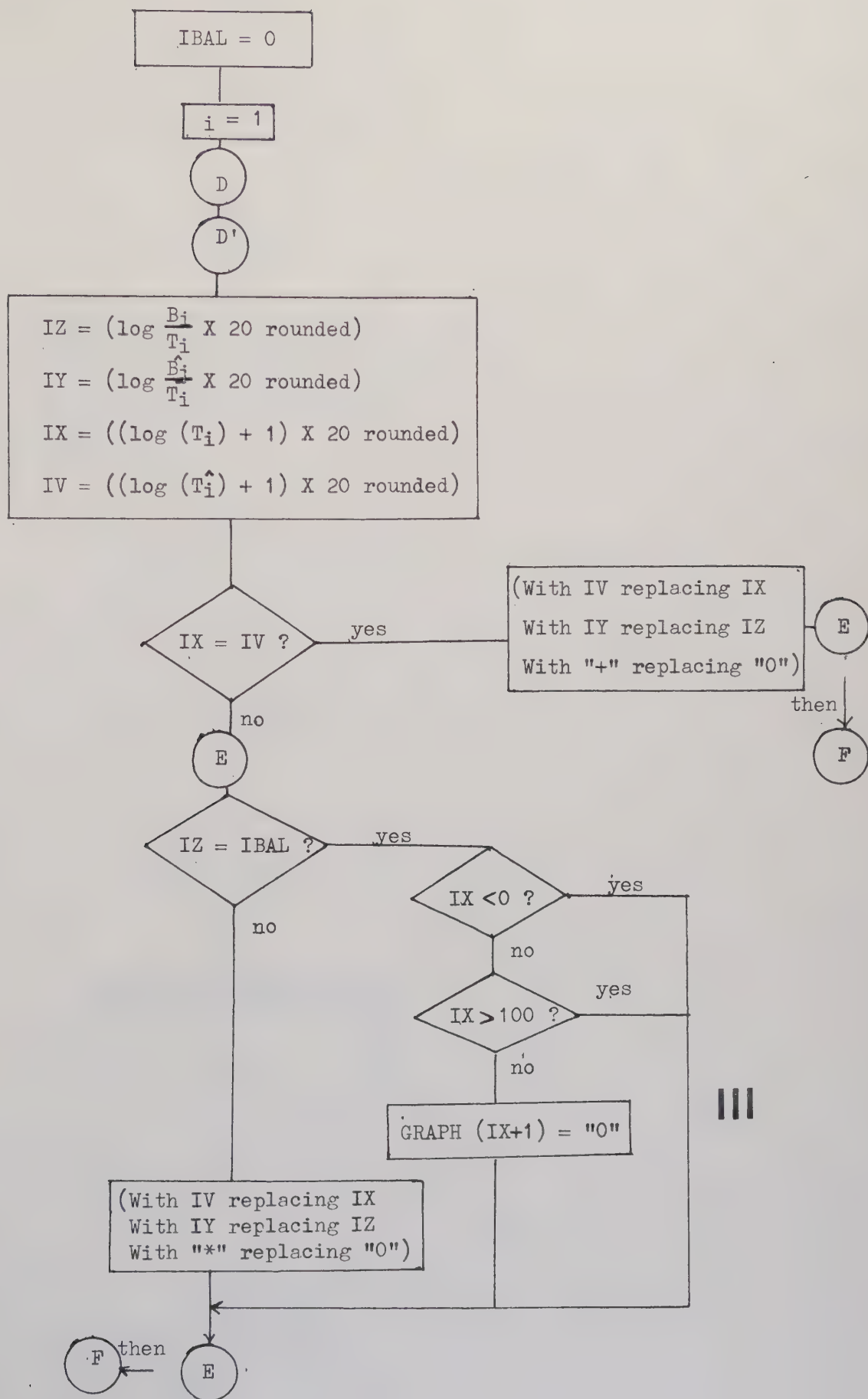
(Ces temps dépendent évidemment de l'exemple choisi).

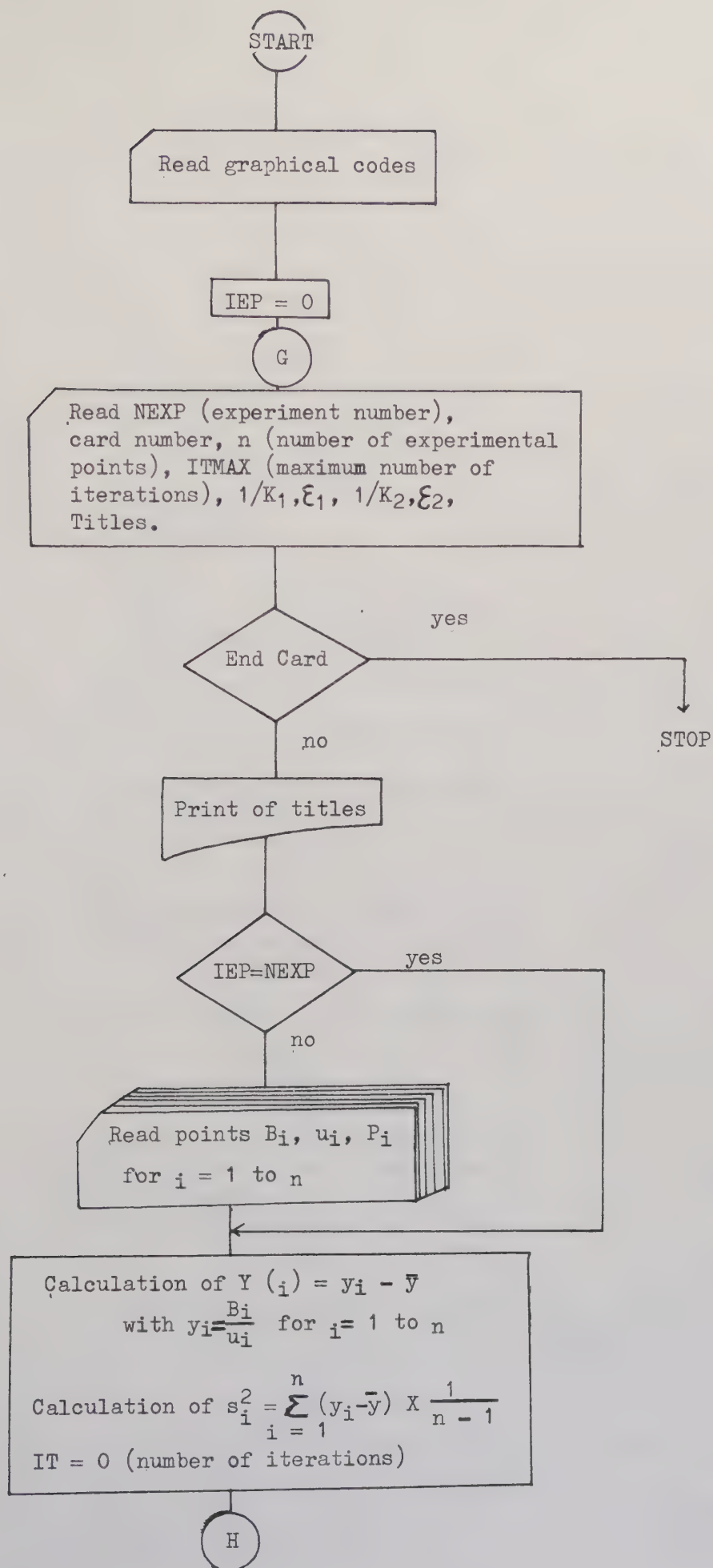




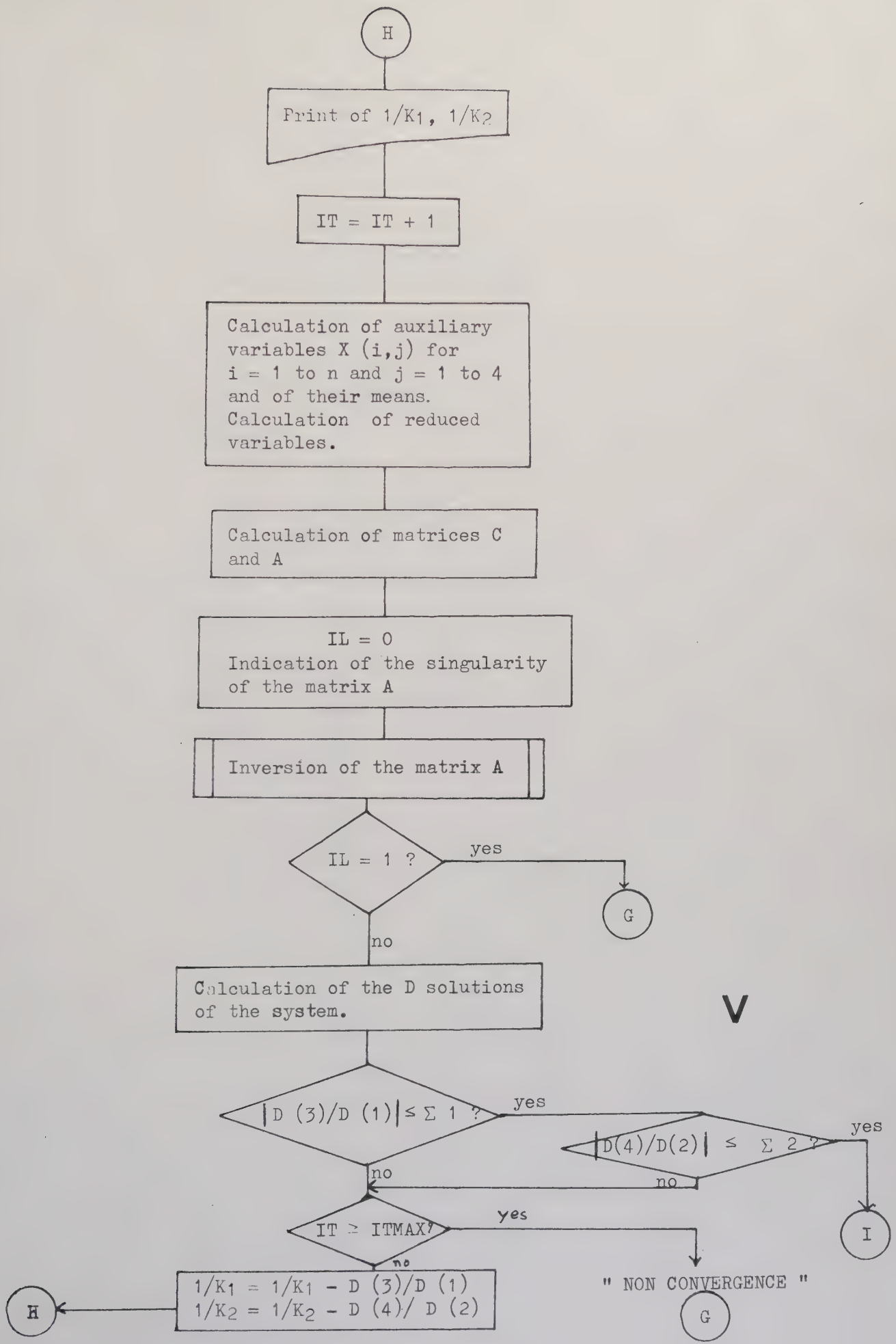


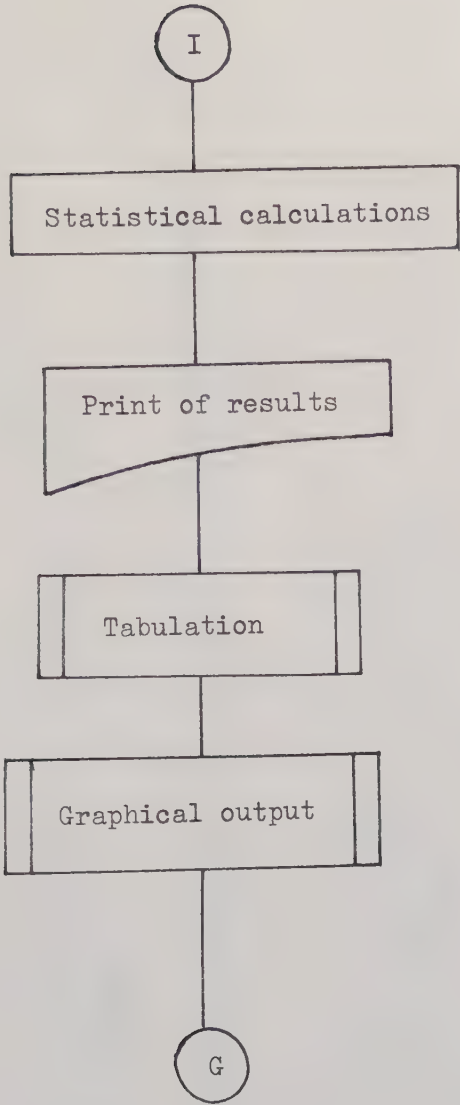
||





IV





PROG.BEA(7) * 4 OU 5 PARAMETRES * REGRESSION EN (K + K2) ET (K1 . K2)
EXPERIENCE 2 DEUXIEME PRODUIT

K3N3 = 0.3000E-01 K1N1 + K2N2 = 0.4200E 01 N1 +N2 = 0.1010E 03

K1 + K2 = 0.4534D 01 K1 . K2 = 0.8169D-02

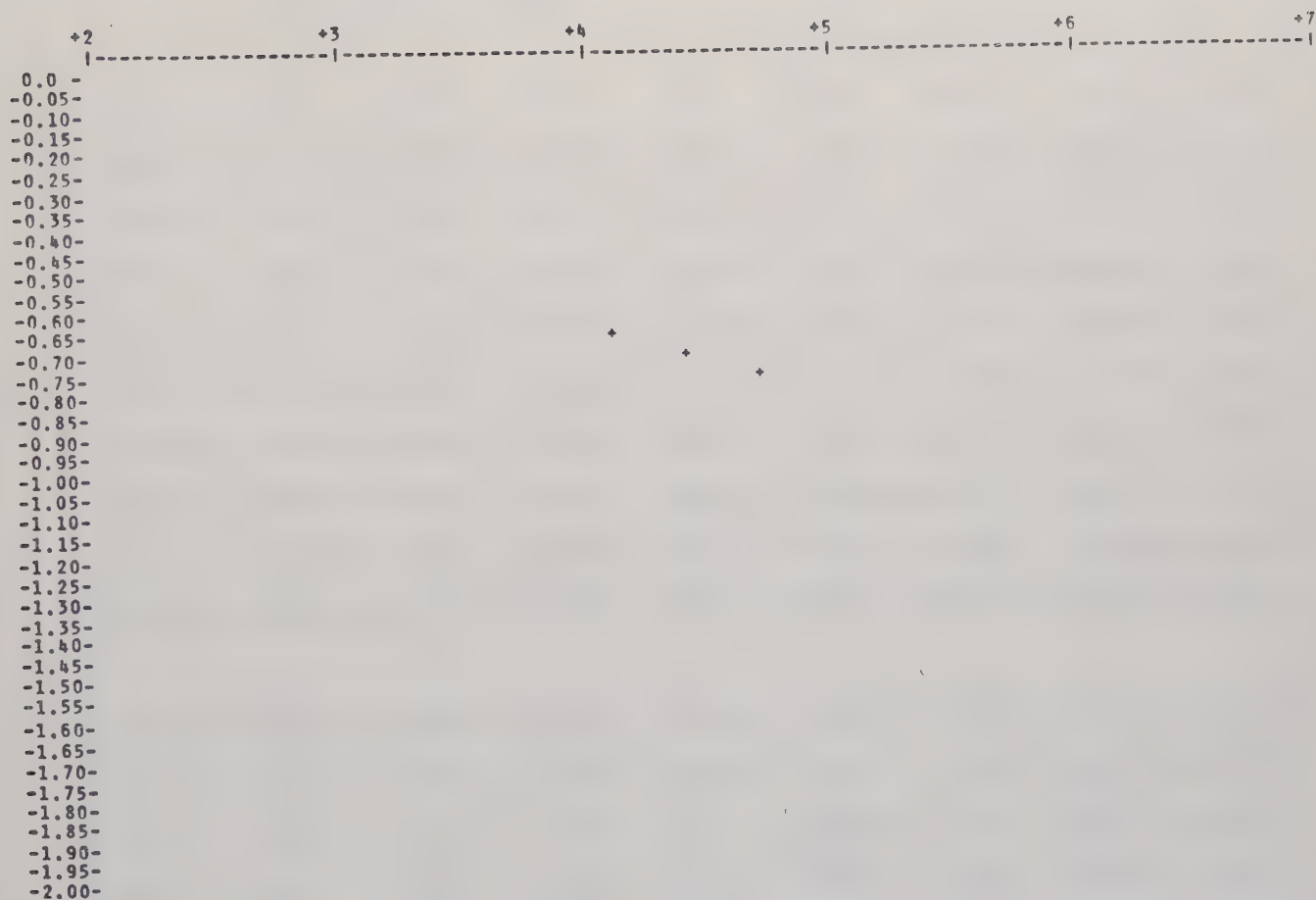
K3N3 = 0.3000E-01
K2N2 = 0.1805E 00
K2 = 0.1803D-02 1/K2 = 0.5548E 03
K1N1 = 0.4020E 01
K1 = 0.4532D 01 1/K1 = 0.2207E 00

U	B.OBS	B.CAL	T.OBS	T.CAL	U/T.OBS	U/T.CAL	R/T.OBS	R/T.CAL
0.1024E 02	0.3000E 01	0.2990E 01	0.1324E 02	0.1323E 02	0.7734E 00	0.7740E 00	0.2266E 00	0.2260E 00
0.1010E 01	0.4771E 00	0.4757E 00	0.1122E 01	0.1122E 01	-0.1116E 00	-0.1113E 00	-0.6448E 00	-0.6459E 00
0.2048E 02	0.5040E 01	0.5056E 01	0.2552E 02	0.2554E 02	0.8025E 00	0.8020E 00	0.1975E 00	0.1980E 00
0.1311E 01	0.7024E 00	0.7038E 00	0.1407E 01	0.1407E 01	-0.9555E-01	-0.9583E-01	-0.7044E 00	-0.7033E 00
0.4096E 02	0.9000E 01	0.8994E 01	0.4996E 02	0.4995E 02	0.8199E 00	0.8199E 00	0.1801E 00	0.1801E 00
0.1612E 01	0.9542E 00	0.9540E 00	0.1699E 01	0.1699E 01	-0.8626E-01	-0.8621E-01	-0.7444E 00	-0.7446E 00
SOMME DES CARRES DES ECARTS = 0.3944E-03								

X

SORTIE GRAPHIQUE LOGB/T VS LOGT

0 EXPERIENCE
 * THEORIE



FIN DE TRAVAIL

XI

PROG.BEA(5) B/U = K3N3 + N2/(U+1/K2) + N1/(U+1/K1)

EXPERIENCE 2 DEUXIEME PRODUIT

1/K1 0.22100E 00 1/K2 0.55500E 03
 1/K1 0.25475E 00 1/K2 0.36134E 03
 1/K1 0.26508E 00 1/K2 0.44655E 03
 1/K1 0.26404E 00 1/K2 0.46290E 03

FIN DES ITERATIONS

N1 0.1054E 01 0.1798E 00
 N2 0.8236E 02 0.6938E 02
 1/K1 0.2640E 00 0.5747E-01
 1/K2 0.4629E 03 0.3833E 03
 K3N3 0.3776E-01 0.5280E-01

U	B.OBS	B.CAL	T.OBS	T.CAL	U/T.OBS	U/T.CAL	B/T.OBS	R/T.CAL
0.1000E-01	0.4400E-01	0.4060E-01	0.5400E-01	0.5060E-01	0.1852E 00	0.1976E 00	0.8148E 00	0.8024E 00
-0.2000E 01	-0.1357E 01	-0.1391E 01	-0.1268E 01	-0.1296E 01	-0.7324E 00	-0.7042E 00	-0.8894E-01	-0.9561E-01
0.2000E-01	0.7000E-01	0.7850E-01	0.9000E-01	0.9850E-01	0.2222E 00	0.2030E 00	0.7778E 00	0.7970E 00
-0.1699E 01	-0.1155E 01	-0.1105E 01	-0.1046E 01	-0.1007E 01	-0.6532E 00	-0.6924E 00	-0.1091E 00	-0.9856E-01
0.4000E-01	0.1570E 00	0.1472E 00	0.1970E 00	0.1872E 00	0.2030E 00	0.2136E 00	0.7970E 00	0.7864E 00
-0.1398E 01	-0.8041E 00	-0.8320E 00	-0.7055E 00	-0.7276E 00	-0.6924E 00	-0.6703E 00	-0.9847E-01	-0.1044E 00
0.8000E-01	0.2800E 00	0.2623E 00	0.3600E 00	0.3423E 00	0.2222E 00	0.2337E 00	0.7778E 00	0.7663E 00
-0.1097E 01	-0.5528E 00	-0.5813E 00	-0.4437E 00	-0.4657E 00	-0.6532E 00	-0.6313E 00	-0.1091E 00	-0.1156E 00
0.1600E 00	0.3900E 00	0.4321E 00	0.5500E 00	0.5921E 00	0.2909E 00	0.2702E 00	0.7091E 00	0.7298E 00
-0.7959E 00	-0.4089E 00	-0.3645E 00	-0.2596E 00	-0.2276E 00	-0.5362E 00	-0.5682E 00	-0.1493E 00	-0.1368E 00
0.3200E 00	0.5800E 00	0.6463E 00	0.9000E 00	0.9663E 00	0.3556E 00	0.3312E 00	0.6444E 00	0.6688E 00
-0.4948E 00	-0.2366E 00	-0.1896E 00	-0.4576E-01	-0.1490E-01	-0.4491E 00	-0.4799E 00	-0.1908E 00	-0.1747E 00
0.6400E 00	0.9400E 00	0.8838E 00	0.1580E 01	0.1524E 01	0.4051E 00	0.4200E 00	0.5949E 00	0.5800E 00
-0.1938E 00	-0.2687E-01	-0.5366E-01	0.1987E 00	0.1829E 00	-0.3925E 00	-0.3767E 00	-0.2255E 00	-0.2366E 00
0.1280E 01	0.1230E 01	0.1149E 01	0.2510E 01	0.2429E 01	0.5100E 00	0.5270E 00	0.4900E 00	0.4730E 00
0.1072E 00	0.8990E-01	0.6028E-01	0.3997E 00	0.3854E 00	-0.2925E 00	-0.2782E 00	-0.3098E 00	-0.3251E 00
0.2560E 01	0.1390E 01	0.1505E 01	0.3950E 01	0.4065E 01	0.6481E 00	0.6298E 00	0.3519E 00	0.3702E 00
0.4082E 00	0.1430E 00	0.1775E 00	0.5966E 00	0.6090E 00	-0.1884E 00	-0.2008E 00	-0.4536E 00	-0.4316E 00
0.5120E 01	0.2230E 01	0.2096E 01	0.7350E 01	0.7216E 01	0.6966E 00	0.7095E 00	0.3034E 00	0.2905E 00
0.7093E 00	0.5485E 00	0.3214E 00	0.8663E 00	0.8583E 00	-0.1570E 00	-0.1490E 00	-0.5180E 00	-0.5369E 00
0.1024E 02	0.3000E 01	0.3196E 01	0.1324E 02	0.1344E 02	0.7734E 00	0.7621E 00	0.2266E 00	0.2379E 00
0.1010E 01	0.4771E 00	0.5046E 00	0.1122E 01	0.1128E 01	-0.1116E 00	-0.1180E 00	-0.6448E 00	-0.6236E 00
0.2048E 02	0.5040E 01	0.5303E 01	0.2552E 02	0.2578E 02	0.8025E 00	0.7943E 00	0.1975E 00	0.2057E 00
0.1311E 01	0.7024E 00	0.7245E 00	0.1407E 01	0.1411E 01	-0.9555E-01	-0.1000E 00	-0.7044E 00	-0.6868E 00
0.4096E 02	0.9000E 01	0.9288E 01	0.4996E 02	0.5025E 02	0.8199E 00	0.8152E 00	0.1801E 00	0.1848E 00
0.1612E 01	0.9542E 00	0.9679E 00	0.1699E 01	0.1701E 01	-0.8626E-01	-0.8876E-01	-0.7444E 00	-0.7332E 00
0.8192E 02	0.1900E 02	0.1653E 02	0.1009E 03	0.9845E 02	0.8117E 00	0.8321E 00	0.1883E 00	0.1679E 00
0.1913E 01	0.1279E 01	0.1218E 01	0.2004E 01	0.1993E 01	-0.9059E-01	-0.7981E-01	-0.7252E 00	-0.7750E 00
0.1638E 03	0.2800E 02	0.2876E 02	0.1918E 03	0.1926E 03	0.8540E 00	0.8506E 00	0.1460E 00	0.1494E 00
0.2214E 01	0.1447E 01	0.1459E 01	0.2283E 01	0.2285E 01	-0.6853E-01	-0.7026E-01	-0.8357E 00	-0.8258E 00
0.3277E 03	0.5500E 02	0.4756E 02	0.3827E 03	0.3753E 03	0.8563E 00	0.8733E 00	0.1437E 00	0.1267E 00
0.2515E 01	0.1740E 01	0.1677E 01	0.2583E 01	0.2574E 01	-0.6738E-01	-0.5886E-01	-0.8425E 00	-0.8971E 00
0.6554E 03	0.7100E 02	0.7407E 02	0.7264E 03	0.7295E 03	0.9023E 00	0.8985E 00	0.9774E-01	0.1015E 00
0.2817E 01	0.1851E 01	0.1870E 01	0.2861E 01	0.2863E 01	-0.4467E-01	-0.4650E-01	-0.1010E 01	-0.9934E 00
0.1311E 04	0.1020E 03	0.1114E 03	0.1413E 04	0.1422E 04	0.9278E 00	0.9217E 00	0.7219E-01	0.7033E-01
0.3118E 01	0.2009E 01	0.2047E 01	0.3150E 01	0.3153E 01	-0.3254E-01	-0.3542E-01	-0.1142E 01	-0.1106E 01
0.2621E 04	0.1800E 03	0.1700E 03	0.2801E 04	0.2791E 04	0.9357E 00	0.9391E 00	0.6426E-01	0.6091E-01
0.3418E 01	0.2255E 01	0.2230E 01	0.3447E 01	0.3446E 01	-0.2885E-01	-0.2729E-01	-0.1192E 01	-0.1215E 01

XII

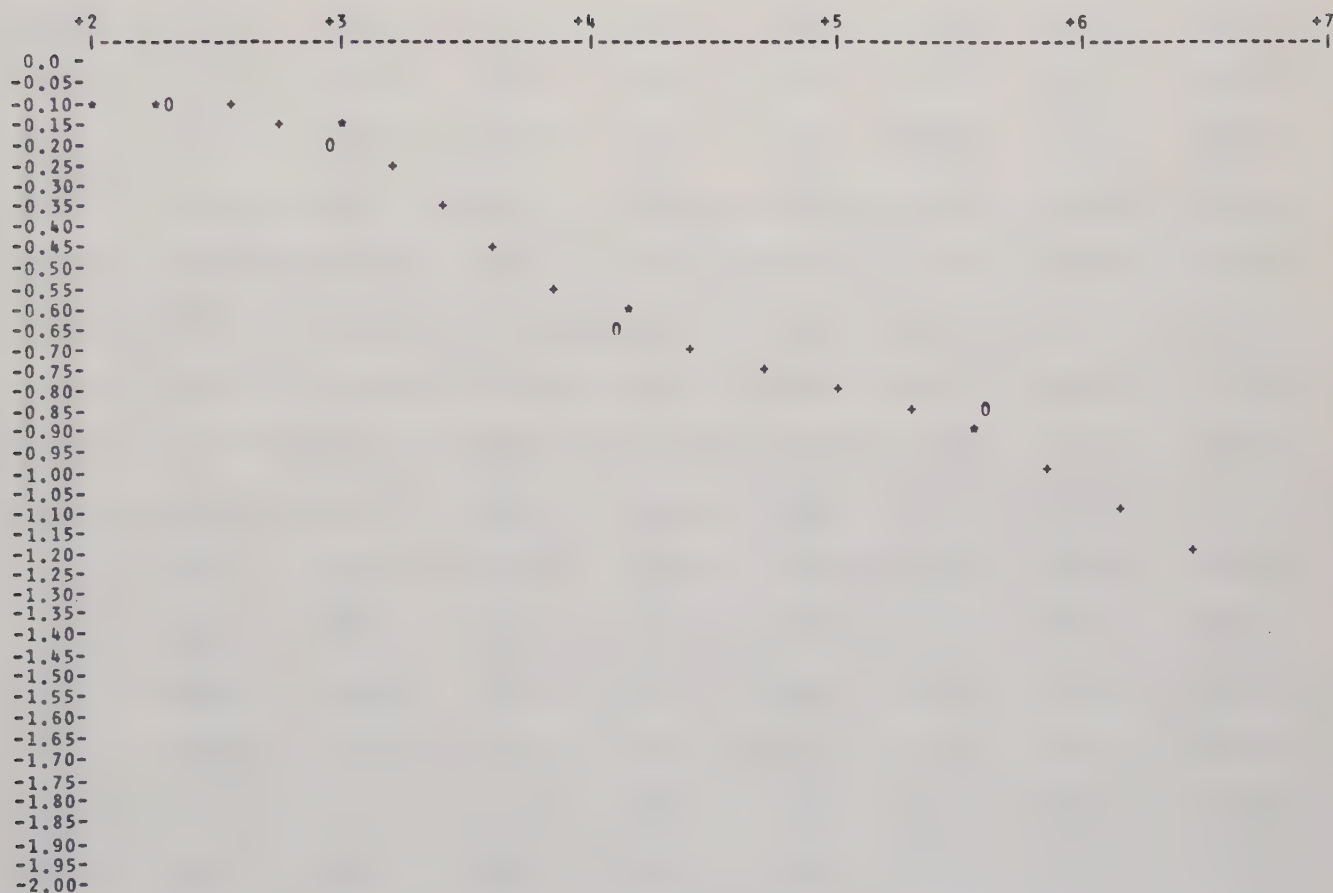
VARIANCE DUE A LA LIAISON 0.9894E 01
 VARIANCE RESIDUELLE 0.3809E-01
 VARIANCE TOTALE 0.2257E 01

F = 0.2598E 03

DEGRES DE LIBERTE = 4 ET 14

SORTIE GRAPHIQUE LOGB/T VS LOGT

0 EXPERIENCE
 * THEORIE
 + EXPERIENCE=THEORIE



FIN DE TRAVAIL

XIII

PROG. BEA (3) 8/U = K2N2 + N1/(U+1/K1)

EXPERIENCE 1 PREMIER PRODUIT

1/K1 = 0.2000E 00

1/K1 = 0.2387E 00

1/K1 = 0.2544E 00

1/K1 = 0.2571E 00

FIN DES ITERATIONS

N1 0.1003E 01 0.1332E 00

1/K1 0.2571E 00 0.3795E-01

K2N2 0.2047E 00 0.5738E-01

U	B.OBS	B.CAL	T.OBS	T.CAL	U/T.OBS	U/T.CAL	R/T.OBS	R/T.CAL
0.1000E-01	0.4404E-01	0.3961E-01	0.5404E-01	0.4961E-01	0.1850E 00	0.2016E 00	0.8150E 00	0.7984E 00
-0.2000E 01	-0.1356E 01	-0.1402E 01	-0.1267E 01	-0.1304E 01	-0.7327E 00	-0.6956E 00	-0.8887E-01	-0.9777E-01
0.2000E-01	0.7000E-01	0.7651E-01	0.9000E-01	0.9651E-01	0.2222E 00	0.2072E 00	0.7778E 00	0.7928E 00
-0.1699E 01	-0.1155E 01	-0.1116E 01	-0.1046E 01	-0.1015E 01	-0.6532E 00	-0.6835E 00	-0.1091E 00	-0.1009E 00
0.4000E-01	0.1320E 00	0.1433E 00	0.1720E 00	0.1833E 00	0.2326E 00	0.2183E 00	0.7674E 00	0.7817E 00
-0.1398E 01	-0.8794E 00	-0.8439E 00	-0.7645E 00	-0.7369E 00	-0.6335E 00	-0.6610E 00	-0.1150E 00	-0.1069E 00
0.8000E-01	0.2700E 00	0.2545E 00	0.3500E 00	0.3345E 00	0.2286E 00	0.2392E 00	0.7714E 00	0.7608E 00
-0.1097E 01	-0.5686E 00	-0.5943E 00	-0.4559E 00	-0.4756E 00	-0.6410E 00	-0.6213E 00	-0.1127E 00	-0.1187E 00
0.1600E 00	0.3820E 00	0.4176E 00	0.5420E 00	0.5776E 00	0.2952E 00	0.2770E 00	0.7048E 00	0.7230E 00
-0.7959E 00	-0.4179E 00	-0.3792E 00	-0.2660E 00	-0.2384E 00	-0.5299E 00	-0.5575E 00	-0.1519E 00	-0.1409E 00
0.3200E 00	0.6800E 00	0.6218E 00	0.1000E 01	0.9418E 00	0.3200E 00	0.3398E 00	0.6800E 00	0.6602E 00
-0.4948E 00	-0.1675E 00	-0.2063E 00	-0.2589E-07	-0.2602E-01	-0.4948E 00	-0.4688E 00	-0.1675E 00	-0.1803E 00
0.6400E 00	0.9200E 00	0.8468E 00	0.1560E 01	0.1487E 01	0.4103E 00	0.4305E 00	0.5897E 00	0.5695E 00
-0.1938E 00	-0.3621E-01	-0.7223E-01	0.1931E 00	0.1722E 00	-0.3869E 00	-0.3661E 00	-0.2293E 00	-0.2445E 00
0.1280E 01	0.1000E 01	0.1098E 01	0.2280E 01	0.2378E 01	0.5614E 00	0.5384E 00	0.4386E 00	0.4616E 00
0.1072E 00	0.0	0.4041E-01	0.3579E 00	0.3761E 00	-0.2507E 00	-0.2689E 00	-0.3579E 00	-0.3357E 00
0.2560E 01	0.1320E 01	0.1436E 01	0.3880E 01	0.3996E 01	0.6598E 00	0.6407E 00	0.3402E 00	0.3593E 00
0.4082E 00	0.1206E 00	0.1571E 00	0.5888E 00	0.6016E 00	-0.1806E 00	-0.1934E 00	-0.4683E 00	-0.4445E 00
0.5120E 01	0.2100E 01	0.2003E 01	0.7220E 01	0.7123E 01	0.7091E 00	0.7188E 00	0.2909E 00	0.2812E 00
0.7093E 00	0.3222E 00	0.3017E 00	0.8585E 00	0.8527E 00	-0.1493E 00	-0.1434E 00	-0.5363E 00	-0.5509E 00
0.1024E 02	0.2900E 01	0.3075E 01	0.1314E 02	0.1331E 02	0.7793E 00	0.7691E 00	0.2207E 00	0.2309E 00
0.1010E 01	0.4624E 00	0.4878E 00	0.1119E 02	0.1124E 01	-0.1083E 00	-0.1140E 00	-0.6562E 00	-0.6365E 00
0.2048E 02	0.5600E 01	0.5183E 01	0.2608E 02	0.2566E 02	0.7853E 00	0.7980E 00	0.2147E 00	0.2020E 00
0.1311E 01	0.7482E 00	0.7145E 00	0.1416E 01	0.1409E 01	-0.1050E 00	-0.9797E-01	-0.6681E 00	-0.6948E 00
0.4096E 02	0.1000E 02	0.9380E 01	0.5096E 02	0.5034E 02	0.8038E 00	0.8137E 00	0.1962E 00	0.1863E 00
0.1612E 01	0.1000E 01	0.9722E 00	0.1707E 01	0.1702E 01	-0.9487E-01	-0.8956E-01	-0.7072E 00	-0.7297E 00
0.8192E 02	0.1570E 02	0.1777E 02	0.9762E 02	0.9969E 02	0.8392E 00	0.8218E 00	0.1608E 00	0.1782E 00
0.1913E 01	0.1196E 01	0.1250E 01	0.1990E 01	0.1999E 01	-0.7615E-01	-0.8525E-01	-0.7936E 00	-0.7490E 00
0.1638E 03	0.3100E 02	0.3453E 02	0.1948E 03	0.1983E 03	0.8409E 00	0.8259E 00	0.1591E 00	0.1741E 00
0.2214E 01	0.1491E 01	0.1538E 01	0.2290E 01	0.2297E 01	-0.7528E-01	-0.8307E-01	-0.7982E 00	-0.7592E 00
0.3277E 03	0.7200E 02	0.6807E 02	0.3997E 03	0.3958E 03	0.8199E 00	0.8280E 00	0.1801E 00	0.1720E 00
0.2515E 01	0.1857E 01	0.1833E 01	0.2602E 01	0.2597E 01	-0.8626E-01	-0.8197E-01	-0.7444E 00	-0.7645E 00
0.6554E 03	0.1420E 03	0.1351E 03	0.7974E 03	0.7905E 03	0.8219E 00	0.8290E 00	0.1781E 00	0.1710E 00
0.2817E 01	0.2152E 01	0.2131E 01	0.2902E 01	0.2898E 01	-0.8517E-01	-0.8142E-01	-0.7494E 00	-0.7671E 00
0.1311E 04	0.2420E 03	0.2693E 03	0.1553E 04	0.1580E 04	0.8442E 00	0.8296E 00	0.1558E 00	0.1704E 00
0.3118E 01	0.2384E 01	0.2430E 01	0.3191E 01	0.3199E 01	-0.7357E-01	-0.8114E-01	-0.8074E 00	-0.7685E 00
0.2621E 04	0.5700E 03	0.5374E 03	0.3191E 04	0.3158E 04	0.8214E 00	0.8298E 00	0.1786E 00	0.1702E 00
0.3418E 01	0.2756E 01	0.2730E 01	0.3504E 01	0.3499E 01	-0.8546E-01	-0.8101E-01	-0.7481E 00	-0.7691E 00

XIV

VARIANCE DUE A LA LIAISON 0.1811E 02
VARIANCE RESIDUELLE 0.3287E-01
VARIANCE TOTALE 0.2042E 01

F = 0.5510E 03

DEGRES DE LIBERTE = 2 ET 16

SORTIE GRAPHIQUE LOGR/T VS LOGT

O EXPERIENCE
 * THEORIE
 + EXPERIENCE=THEORIE

